

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERÍSTICAS  
MORFOANATÔMICAS E ECOFISIOLÓGICAS DE  
*Aphelandra nitida* Ness & Mart. (ACANTHACEAE)**

**Livia Zottele**

**Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Tropical**

**Mestrado em Biodiversidade Tropical**

**São Mateus, Fevereiro de 2017**

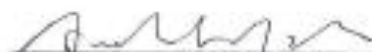
LÍVIA ZOTELLE

DESENVOLVIMENTO, CARACTERÍSTICAS MORFO-ANATÔMICAS E  
ECOFISIOLÓGICAS DE *APHELANDRA NITIDA* NESS & MART.  
(ACATHACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Antelmo Ralph Faiqueto  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador



Profa. Dra. Camilla Rozindo Dias  
Milanez  
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Anderson Geyson Alves de  
Araújo  
Universidade Federal do Espírito Santo

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP) (Divisão de Biblioteca Setorial do CEUNES - BC, ES, Brasil)

---

Z89d Zottele, Livia, 1993-  
Desenvolvimento, características morfoanatômicas e ecofisiológicas de *aphelandra nitida* ness & mart.(acanthaceae)/ Livia Zottele. – 2017. 142 f. : il.

Orientador: Antelmo Ralph Falqueto.

Coorientador: Elisa Mitsuko Aoyama.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo.

1. Plantas - Propagação por estaquia. 2. Germinação. 3. Sementes. 4. Anatomia vegetal. I. Falqueto, Antelmo Ralph. II. Aoyama, Elisa Mitsuko. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. IV. Título.

---

CDU: 502

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelos constantes ensinamentos que proporciona em minha vida. Pela força concedida nos momentos difíceis. Por todas as graças alcançadas durante este trabalho.

A Dra. Elisa Mitsuko Aoyama, minha orientadora. Agradeço pelos seis anos de convivência e profissionalismo. Obrigada por me proporcionar ensinamentos que serão levados por toda minha vida. Obrigada pela orientação, dedicação e amizade. Por sempre acreditar em mim e fazer o possível e impossível para tudo dar certo.

Ao Dr. Antelmo Ralph Falqueto, por ter aceitado me orientar durante esses dois anos, me proporcionando um grande crescimento acadêmico. Obrigada pelo apoio e confiança.

À Universidade Federal do Espírito Santo, através do Programa de pós-graduação em Biodiversidade Tropical, pela oportunidade de realizar deste trabalho.

À FAPES (Fundação de amparo à pesquisa do Espírito Santo) pela bolsa concedida.

Aos pesquisadores do Instituto de Botânica de São Paulo, pela recepção e apoio no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada à pesquisadora Dr. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros, pelos ensinamentos.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Física e Química (DFQ) da Unesp de Ilha Solteira, e as professoras Dra. Aline Redondo Martins e Dra. Denise Gallo Pizella pelo apoio com as análises e a digitalização das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos professores Moisés Zucoloto, coordenador do laboratório de Tecnologia de Sementes; Julien Chiquieri, coordenador do Laboratório de Nutrição Animal; Luis Fernando Duboc, coordenador do laboratório de Vertebrados Aquáticos, e Juliana Castro Monteiro, coordenadora do laboratório de Biologia Estrutural, pela concessão do uso dos equipamentos.

Ao setor de transporte, pela disponibilidade de carro para realização das coletas.

Aos meus pais, Regina Cerri e Adilson L. Zottele, pelo amor incondicional, pelo apoio, incentivo, sempre indispensável.

Ao Marcos, meu namorado, obrigada pelo companheirismo, pelo amor, carinho e preocupação. Agradeço por ter me ajudado direta e indiretamente no meu trabalho, me ajudando nas coletas e nas fotografias.

Aos meus irmãos Milena e Luiz Antonio, pelas conversas e incentivo. Mi, obrigada por ler minha dissertação (mesmo te obrigando) e por me escutar mesmo quando não entendia nada.

Aos professores do programa em Biodiversidade Tropical, pelos conhecimentos adquiridos e compartilhados. Muito Obrigada!

As BioGatas, Natane, Luena, Fabiane, Patrícia, Izabela e Débora, pelos momentos de descontração.

A Natane Sartor, amiga e companheira de estudos que conviveu comigo diretamente durante seis anos de república. Muito obrigada por me aturar todo esse tempo.

A Patricia Denoni, que me auxiliou nas coletas do material biológico.

Aos colegas do laboratório, Fabiane, Luena, Letícia, Gabi, Gabriele, Weslaine, Lana, João, Michelli, pela companhia e apoio na realização desse trabalho, tornando os dias no laboratório mais agradável e divertido.

Aos colegas da pós-graduação, agradeço a toda experiência adquirida com vocês.

Os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	XII
RESUMO GERAL.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
INTRODUÇÃO GERAL.....	16
Referências Bibliográficas.....	18
<b>CAPÍTULO I - Caracterização estrutural de frutos, sementes e germinação de <i>Aphelandra nitida</i> Ness &amp; Mart. (Acanthaceae).....</b>	<b>21</b>
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1 Local de coleta.....	25
2.2 Material vegetal.....	25
2.3 Caracterização estrutural dos frutos e sementes.....	26
2.4 Testes histoquímicos das sementes.....	27
2.5 Protocolo de desinfestação.....	28
2.6 Germinação.....	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.1 Caracterização estrutural dos frutos e sementes.....	30
3.2 Testes histoquímicos das sementes.....	36
3.3 Protocolo de desinfestação.....	39
3.4 Germinação.....	41
4. CONCLUSÃO.....	44
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
<b>CAPÍTULO II - Desenvolvimento pós-seminal de <i>Aphelandra nitida</i> Ness &amp; Mart. (Acanthaceae).....</b>	<b>53</b>

RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4. CONCLUSÃO.....	61
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
<b>CAPÍTULO III - Influência dos diferentes tipos de estacas caulinares no enraizamento e morfoanatomia de <i>Aphelandra nitida</i> Ness &amp; Mart.....</b>	<b>64</b>
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	65
1. INTRODUÇÃO.....	66
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4. CONCLUSÃO.....	81
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
<b>IV CAPÍTULO - Efeitos do sombreamento sobre os aspectos morfoanatômicos e ecofisiológicos em <i>Aphelandra nitida</i> Ness &amp; Mart.....</b>	<b>88</b>
RESUMO.....	88
ABSTRACT.....	89
1. INTRODUÇÃO.....	90
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	92
2.1 Material vegetal.....	92
2.2 Experimento.....	92
2.3 Biometria foliar.....	93
2.4 Área foliar.....	94
2.5 Determinação de massa.....	95
2.6 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	95
2.7 Determinação de pigmentos fotossintéticos.....	95

2.8 Anatomia e histoquímica foliar.....	96
2.9 Análises estatísticas.....	98
3. RESULTADOS.....	98
3.1 Biometria foliar.....	98
3.2 Determinação de massa.....	101
3.3 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	102
3.4 Determinação de pigmentos fotossintéticos.....	104
3.5 Anatomia e histoquímica foliar.....	105
4. DISCUSSÃO.....	118
5. CONCLUSÃO.....	128
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>141</b>



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1-** Coleta dos frutos e sementes de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. (A) Frutos imaturos envolvido por sacos de tule (poliamida); (B) Preparação das armadilhas; (C) Frutos de diferentes indivíduos envolvidos por sacos de tule, como indicado pela seta amarela; (D) Coleta dos frutos e sementes maduros.....26

**Figura 2-** Esquemas do fruto e semente de *A. nitida* Ness & Mart., indicando as regiões mensuradas. (A) Fruto aberto; (B) Valva vista internamente; (C) Semente. a = comprimento, b = largura, c = comprimento da porção fértil, d = comprimento da porção estéril, e = espessura, f = comprimento do retináculo.....28

**Figura 3-** Fruto e semente de *A. nitida* Ness & Mart. (A) Fruto aberto; (B) Valva vista internamente; (C) detalhes das porções fértil e estéril da valva. (D) Fruto visto internamente mostrando as sementes assentadas no retináculo (E) Semente. r= retináculo; m= micrópila.....35

**Figura 4-** Semente de *A. nitida* Ness & Mart. em Microscopia Eletrônica de Varredura. (A) Base da semente, evidenciando a assimetria; (B) Detalhe do ápice, apresentando a distribuição das papilas epidérmicas em fileiras; (C) Detalhe da face superior da semente, com enfoque no aspecto triangular; (E) Detalhe da margem, (F) Microescultura da testa evidenciando protuberâncias de aspecto ruguloso-tuberculado. (G) Detalhe da superfície da testa e das pequenas depressões epidérmicas.....36

**Figura 5-** Secções transversais dos cotilédones da semente de *Aphelandra nitida* Ness & Mart., evidenciando o resultados dos testes histoquímicos para constatação do tecido de reserva. (A) Tratamento controle, sem adição de reagente; (B) Secção tratada com Sudam IV evidenciando a presença de lipídeos; (C) Secção tratada com Solução de Hidróxido de potássio + Sulfato de Cobre II, demonstrando a reação negativa para proteína; (D) Secção tratada com solução de Lugol, caracterizando reação negativa para amido.....38

### CAPÍTULO II

**Figura 1-** (A-I) Aspectos morfológicos das plântulas de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. Cot\*- Cotilédone no interior do tegumento; C- coifa; Ep- Epicótilo; Hp- Hipocótilo; Ra-Raiz primária; Rp- Alongamento da raiz primária; Rs- Raiz secundária; Tg- Tegumento da semente.....60

**Figura 2-** Plântulas de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. (A) Seta indicando o acúmulo de antocianina na raiz, mostrado pela coloração vermelha; (B) Plântula completamente formada aos 60 dias; (B-C) Plântulas com anisofilia (folhas com tamanho e formas diferenciadas). rp- raiz principal; rs- raiz secundária; hp- hipocótilo; ep- epicótilo; c- colo; t- tegumento; p- paracotilédone.....61

### CAPÍTULO III

**Figura 1-** Montagem do experimento de estaquia caulinar de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. A- Espécie em seu habitat natural; B- Estacas Caulinares; C- Separação dos tipos de estacas utilizados no experimento: (b) basais, (m) medianas, (a) apicais; D- Estacas caulinares mantidas em copos plásticos contendo substrato vermiculita.....70

**Figura 2-** Porcentagem de enraizamento das estacas de *Aphelandra nitida* Ness & Mart., após 40, 60 e 80 dias após o plantio. \*Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.....71

**Figura 3-** Porcentagem de mortalidade das estacas de *Aphelandra nitida* Ness & Mart., após 40, 60 e 80 dias após o plantio.\*Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.....72

**Figura 4-** Estacas caulinares de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. A- estacas antes do processo de enraizamento; B- estacas enraizadas no período de 40 dias após o plantio (DAP); C- estacas enraizadas no período de 60 (DAP); D- estacas enraizadas no período de 80 (DAP); E- aspecto geral das estacas no substrato vermiculita. (b) estacas basais; (m) estacas medianas; (a) estacas apicais.....74

**Figura 5.** Secções transversais de estacas caulinares de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. A-B- Estacas apicais antes do enraizamento; B- Detalhe do feixe vasculares das estacas apicais, C- Detalhe do xilema primário e secundário das estacas basais; D- detalhe dos cristais do tipo ráfides localizados no parênquima; E-H- Estacas medianas; E- região do câmbio vascular; F- início da formação da raiz; H-Região de conexão da raiz adventícia com o caule. e=epiderme; co=colênquima; p=parênquima; c=câmbio; XI= xilema primário; x= xilema secundário r=raiz. Seta indica a presença de cristais de ráfides.....79

**Figura 6.** Secções longitudinais de estacas caulinares apicais de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. A-C- estacas antes do enraizamento; C- detalhe do feixe vascular; C-D- início da diferenciação radicular. e=epiderme; co=colênquima; p=parênquima; fv= feixe vascular; x= xilema secundário; r=raiz.....80

### CAPÍTULO IV

**Figura 1.** Montagem do experimento com *Aphelandra nitida* Ness & Mart. submetidas a diferentes condições de sombreamento. (A) coleta do solo proveniente da Restinga do bairro Liberdade, São Mateus-ES; (B) transplante das estacas enraizadas para copos contendo solo; (C) Detalhe das folhas marcadas com linha para diferenciação das folhas novas; (D) Detalhe da estrutura de madeira coberta com tela; (E) Indivíduos expostos a condição de 85% de sombreamento; (F) Indivíduos expostos aos regimes de 75, 60 e 35% de sombreamento e pleno sol como indicado na imagem.....94

<b>Figura 2.</b> Medidas do diâmetro equatorial (DE) e diâmetro polar (DP) de um estômato.....	98
<b>Figura 3.</b> Efeitos das diferentes condições de sombreamento sobre a fluorescência Inicial ( $F_0$ ) (A); eficiência fotoquímica máxima do FSII (FV/FM) (B); fluxo de energia absorvida por CR (ABS/RC) (C); Fluxo de energia dissipada por CR (DI0/RC) (D); índice de desempenho $PI_{ABS}$ (E), em plantas de <i>A. nitida</i> Ness & Mart. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.....	103
<b>Figura 4.</b> Secções paradérmicas foliares de indivíduos de <i>Aphelandra nitida</i> Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento. (A-E) Face abaxial; (F) Face ; adaxial; (A) 85% (B) 75% (C) 60% (D) 35% (E) Pleno sol.....	106
<b>Figura 5.</b> Secções transversais do limbo de indivíduos de <i>A. nitida</i> Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento. (A-B) 85% (C) 75% (D-E) 60% (F-G) 35% (H-I) pleno sol. Pp- parênquima paliçádico; Pl- Parênquima lacunoso; tg- tricoma glandular; tt- tricoma tector. Seta indica os feixes acessórios distribuídos no mesofilo.....	110
<b>Figura 6.</b> Secções transversais do limbo de indivíduos de <i>A. nitida</i> Ness & Mart. em diferentes condições de sombreamento, submetidos ao reagente Sudan IV para detecção de lipídios totais. (A) 85% (B) 75% (C-D) 60% (E-F) 35% (G-H) Pleno sol. c- cutícula. Seta indica a reação positiva a lipídio.....	111
<b>Figura 7.</b> Secções transversais do limbo de indivíduos de <i>A. nitida</i> Ness & Mart. em diferentes condições de sombreamento, submetidos a solução lugol para detecção de amido. (A) 85% (B) 75% (C) 60% (D-E) 35% (F) Pleno sol. Seta indica a reação positiva a amido.....	112
<b>Figura 8.</b> Secções transversais da nervura central de indivíduos de <i>A. nitida</i> Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento. (A-B) 65% (C-D) 75% (E-F) 60% (G) 35% (H-I) Pleno sol. F- floema; X- xilema; Fb- fibras; AI-área internervural indicado pela seta.....	113
<b>Figura 9.</b> Secção transversal da nervura central de indivíduos de <i>A. nitida</i> Ness & Mart. em diferentes regime de sombreamento, submetidos ao reagente Sudan IV para detecção de lipídios totais. (A-B) 85% (C) 75% (D-E) 60% (F-G) 35% (H-I) Pleno sol. Seta indica a reação positiva a lipídio.....	113
<b>Figura 10.</b> Secção transversal da nervura central de indivíduos de <i>A. nitida</i> Ness & Mart. em diferentes condições de sombreamento, submetidos a solução lugol para detecção de amido (A-B) 85% (C-D) 75% (E-F) 60% (G-H) 35% (I-J) Pleno sol. Seta indica a reação positiva a amido.....	114
<b>Figura 11.</b> Secções transversais do pecíolo de indivíduos de <i>A. nitida</i> Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento. (A-C) 85% (D-F) 75% (G-I) 60%	

(**J-L**) 35% (**M-O**) Pleno sol. **ep**- epiderme; **c**- cutícula; **F**-floema; **X**- xilema; **Fb**- fibras-  
**Fva**- feixe vascular acessório; **Bp**- bainha parenquimática.....115

**Figura 12.** Secção transversal do pecíolo de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. em diferentes condições de sombreamento, submetidos ao reagente Sudan IV para detecção de lipídios totais. (**A-B**) 85% (**C-D**) 75% (**E-F**) 60% (**G-H**) 35% (**I-K**) Pleno sol. Seta indica a reação positiva a lipídio.....116

**Figura 13.** Secção transversal do pecíolo de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. em diferentes condições de sombreamento, submetidos a solução lugol para detecção de amido. (**A-C**) 85% (**D-G**) 75% (**H-J**) 60% (**K-M**) 35% (**N-P**) Pleno sol. **Rf**- cristais do tipo ráfides Seta indica a reação positiva a amido.....117

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1-</b> Estatística descritiva das dimensões dos frutos maduros de <i>Aphelandra nitida</i> Ness & Mart.....	32
<b>Tabela 2.</b> Estatística descritiva das dimensões das sementes maduras de <i>Aphelandra nitida</i> Ness & Mart.....	34
<b>Tabela 3-</b> Efeito da concentração de Hipoclorito de Sódio (NaClO) e do tempo de imersão, na porcentagem, tempo médio e velocidade média de germinação para sementes de <i>Aphelandra nitida</i> R. Br.....	39
<b>Tabela 4-</b> Efeito de diferentes substratos na porcentagem de germinação, tempo médio de germinação e velocidade média de germinação para sementes de <i>Aphelandra nitida</i> R. Br.....	42

### CAPÍTULO III

<b>Tabela1-</b> Aspectos morfológicos das estacas caulinares de <i>A. nitida</i> Ness & Mart., nos períodos de 40, 60 e 80 dias após o plantio.....	75
---	----

### CAPÍTULO IV

<b>Tabela 1.</b> Média dos valores de intensidade luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) no experimento com indivíduos de <i>A. nitida</i> Ness & Mart., em diferentes níveis de sombreamento.....	93
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros biométricos das folhas de <i>Aphelandra nitida</i> Ness & Mart. cultivadas em diferentes condições de sombreamento.....	100
<b>Tabela 3.</b> Valores de massa fresca e seca de folhas de <i>Aphelandra nitida</i> Ness & Mart. cultivadas em diferentes condições de sombreamento.....	101
<b>Tabela 4.</b> Valores de massa fresca e seca de raízes de <i>Aphelandra nitida</i> Ness & Mart. cultivada em diferentes condições de sombreamento.....	102
<b>Tabela 5.</b> Concentração de pigmentos fotossintéticos em indivíduos de <i>A. nitida</i> Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento. (Chl <i>a</i> = clorofila <i>a</i> ; Chl <i>b</i> = clorofila <i>b</i> ; Carot = carotenoides; Chl <i>a</i> + Chl <i>b</i> = soma total dos valores de clorofila <i>a</i> + clorofila <i>b</i> ; Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i> = razão clorofila <i>a</i> /clorofila <i>b</i> .....	104
<b>Tabela 6.</b> Diâmetro polar e equatorial ( $\mu\text{m}$ ), e funcionalidade dos estômatos de indivíduos de <i>A. nitida</i> Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento.....	105

**Tabela 7.** Densidade Estomática (mm<sup>2</sup>) e índice Estomático (%) de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. submetidas a diferentes condições de sombreamento.....106

**Tabela 8.** Espessura do parênquima paliçádico e lacunoso (µm) em indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento.....108

## RESUMO GERAL

Neste estudo foi avaliada a propagação sexuada e vegetativa, o desenvolvimento pós-seminal, e as características morfoanatômicas e ecofisiológicas de *Aphelandra nitida* submetidas a diferentes gradientes de sombreamento. Para isso, os frutos, sementes e as estacas caulinares foram obtidos na Mata de Restinga localizada no bairro Liberdade, São Mateus-ES. Foram analisadas a biometria e morfologia dos frutos e sementes, e realizados testes de germinação em diferentes substratos. A propagação vegetativa da espécie foi realizada com diferentes tipos de estacas em substrato vermiculita. Após a formação de mudas por propagação vegetativa, estas foram transferidas para estrutura cobertas com telas em diferentes condições de sombreamento, no qual após o término do experimento foram avaliadas as características morfoanatômicas e ecofisiológicas foliares. O fruto consiste em uma cápsula loculicida constituída por duas valvas, que se abrem liberando as sementes. A concentração de hipoclorito de sódio a 5% por 30 minutos é o mais indicado para desinfestação das sementes. Quanto ao substrato, é recomendado a utilização do substrato sobre papel para a germinação da espécie. As informações sobre o desenvolvimento pós-seminal principalmente os caracteres foliares, reforçam as características encontradas nas plantas adultas, sendo estas características morfológicas de grande importância para auxiliar os estudos taxonômicos e interpretar testes de germinação. Os resultados de propagação vegetativa evidenciaram que as estacas basais são as mais indicadas para propagação da espécie, não sendo encontradas barreiras anatômicas que dificultam o enraizamento em nenhum dos tipos de estacas. As condições de sombreamento aos quais as plantas foram submetidas influenciaram fortemente os parâmetros avaliados. As plantas mostraram-se tolerantes ao pleno sol, observando alterações no aparato fotossintético como a redução na eficiência fotoquímica, sendo compensada por uma maior dissipação de calor e investindo em adaptações estruturais, como a redução da área foliar, aumento na espessura do parênquima paliçádico, aumento na densidade estomática e compostos lipídicos no mesofilo. Os resultados do presente trabalho ressaltam a importância de estudos básicos para o entendimento dos mecanismos envolvidos na forma de propagação, tipo de reserva das sementes, desenvolvimento e plasticidade fenotípica das espécies frente às condições ambientais.

Palavras-chave: Estaquia, Germinação, Plântulas, Plasticidade fenotípica

## ABSTRACT

This study vegetative and sexual propagation were evaluated, and the post-seminal development, and the morphological and ecophysiological characteristics of *Aphelandra nitida* submitted to different gradients of shading. The fruits, seeds and stem cuttings were obtained in the Forest of Restinga located in the neighborhood Liberdade, São Mateus-ES. The biometry and morphology of fruits and seeds were analyzed, and germination tests were performed on different substrates. The vegetative propagation of the species was carried out with different types of cuttings in vermiculite substrate. After the formation of vegetative propagation, these were transferred to the structure covered with screens under different shading conditions, in which after the end of the experiment, the morphological and leaves ecophysiological characteristics were evaluated. The fruit consists of a loculicidal capsule constituted by two leaflets, which open releasing the seeds. The 5% sodium hypochlorite concentration for 30 minutes is the most suitable for seed disinfestation. The use of the substrate on paper is recommended for the germination of the species. The information about the post-seminal development, mainly the foliar characters, reinforces the characteristics found in adult plants, being these morphological characteristics of great importance to aid the taxonomic studies and to interpret germination tests. The results of vegetative propagation showed that the basal cuttings are the most suitable for propagation of the species, not being anatomical barriers that hamper the rooting in any of the types of cuttings. The shading conditions to which the plants were subjected strongly influenced the evaluated parameters. The plants were tolerant to the full sun, observing changes in the photosynthetic apparatus as the reduction in the photochemical efficiency, being compensated by a greater dissipation of heat and investing in structural adaptations, as the reduction of the leaf area, increase in the thickness of the palisade parenchyma, Increase in stomatal density and lipid compounds in mesophyll. The results of the present work highlight the importance of basic studies to understand the mechanisms involved in the propagation form, type of seed reserve, development and phenotypic plasticity of the species in relation to environmental conditions.

Key-words: Cutting, Germination, Seedlings, Phenotypic plasticity



## INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica é a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano, (SOS MATA ATLÂNTICA & INPE, 2001), considerada um dos 25 hotspots mundiais de biodiversidade. Embora tenha sido em grande parte destruída, ela ainda abriga mais de 8.000 espécies endêmicas de plantas vasculares, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (MYERS et al., 2000). A Mata Atlântica engloba vários ecossistemas florestais, dentre eles às restingas, nas baixadas arenosas do litoral (BARBOSA & THOMAS, 2002).

De acordo com Tabarelli et al. (2004; 2005), a maioria das espécies oficialmente ameaçadas de extinção no Brasil habitam a Mata Atlântica. Atualmente, mais de 530 espécies de plantas da Mata Atlântica estão ameaçadas, dentre elas *Aphelandra nitida* Ness & Mart. (KOLLMANN et al., 2007). A espécie é endêmica do Brasil, distribuindo-se restritamente nos estados do Espírito Santo, Bahia, Sergipe e Alagoas (PROFICE et al., 2016). Os registros para o Espírito Santo se concentram apenas nos municípios de Sooretama e São Mateus, em áreas de Mussununga e Mata de Restinga respectivamente, associada a ambientes sombreados.

A vegetação de restinga se estende por quase toda a costa no Estado do Espírito, sendo interrompida pela foz de rios (PEREIRA, 2007). Esse ecossistema é composto por um mosaico de comunidades florestais, e formações vegetais florística estruturalmente diferenciadas (ARAUJO & HENRIQUES, 1984; MENEZES & ARAUJO, 2005). As diferentes intensidades de luz nas diversas fisionomias da Restinga podem provocar mudanças anatômicas e fisiológicas nas espécies. Além desse gradiente de diferentes intensidades de luz na Restinga, a abertura de clareiras adiciona outro fator de estresse, como o aumento da radiação solar direta (NASCIMENTO et al., 2008).

Os estudos sobre a cobertura vegetal do estado do Espírito Santo são esparsos, e soma-se a isso a especulação imobiliária que pressiona as áreas mais próximas ao litoral, devastando de maneira demasiada a vegetação de restinga que tem sofrido uma extensiva degradação ao longo dos últimos tempos, sendo as mais importantes delas: a remoção da vegetação para desenvolvimento imobiliário, estabelecimento de espécies exóticas, coleta de espécies vegetais de interesse paisagístico e alteração do substrato original (PIMENTEL; SILVA, 2011).

Devido esse contínuo processo de devastação das restingas, é de suma importância o conhecimento das espécies que ocorrem nesse ecossistema e informações sobre a ecologia, comportamento, mecanismos de dispersão, entre outros, fornecendo uma melhor compreensão dos efeitos das mudanças ambientais e como atingir os objetivos de conservação (GIULIETTI et al., 2005).

A estratégia de conservação da biodiversidade envolve os métodos *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* refere-se à manutenção das espécies no seu habitat por meio de unidades de conservação, como os parques nacionais (PIRATELLI & FRANCISCO, 2013). O método de conservação *ex situ* consiste na conservação das espécies fora do seu habitat e deve ser realizado de forma complementar a conservação *in situ* (PIRATELLI & FRANCISCO, 2013). A conservação *ex situ* pode ser realizada por meio do armazenamento de sementes (FAO, 1993), propagação sexuada e vegetativa, entre outros.

O uso da propagação sexuada propicia uma grande variação genotípica, no entanto, tem limitado a produção comercial de mudas, visto que as sementes de algumas espécies são recalcitrantes (CARVALHO, 2003), além de outros fatores, peculiares a determinadas espécies, como a produção irregular ou baixa de sementes ao longo dos anos, dificultando o suprimento adequado no processo de produção de mudas. (SIMÃO et al., 2007). Por outro lado, as técnicas de propagação vegetativa, dentre elas a estaquia, constituem uma alternativa de superação das dificuldades na propagação de espécies nativas, podendo ser utilizadas para fins comerciais, assim como auxiliar no resgate e conservação de recursos genéticos (DIAS et al., 2012).

Entretanto, a escolha adequada das espécies a serem utilizadas em projetos de restauração depende do conhecimento das adaptações anatômicas e fisiológicas dessas espécies. Informações sobre o ambiente de luz em que a planta cresce é de fundamental importância, pois a adaptação das plantas a este ambiente depende do ajuste de seu sistema fotossintético, de modo que a luminosidade ambiental seja utilizada de maneira mais eficiente possível. As respostas destas adaptações serão refletidas no crescimento global e distribuição local da planta (ENGEL & POGGIANI, 1991).

Tendo em vista o pouco conhecimento acumulado na literatura sobre *A. nitida*, e considerando sua vulnerabilidade e distribuição restrita, os estudos que forneçam subsídios para avaliar a propagação e repostas a diferentes gradientes de luminosidade, assumem valiosa importância. Diante disso, neste estudo pretendeu-se avaliar as formas

de propagação e o desenvolvimento da espécie, e as características morfoanatômicas e ecofisiológicas de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. em diferentes gradientes de sombreamento. Especificamente procurou-se:

- Analisar a morfologia dos frutos e semente, germinação e o desenvolvimento pós-seminal;
- Avaliar a propagação vegetativa por estaquia caular, e identificar as características morfoanatômicas da região de enraizamento;
- Avaliar o crescimento das plantas em diferentes condições de sombreamento, identificando variações na morfologia dos órgãos, fluorescência da clorofila *a*, pigmentos fotossintéticos e anatomia e histoquímica foliar.

### Refêrências Bibliográficas

- ARAÚJO, D.S.D. & HENRIQUES, R.P.B. Análise florística das restingas do estado do Rio de Janeiro. In: L.D. Lacerda, D.S.D. Araújo, R. Cerqueira; B. Turcq (orgs.). **Restingas: Origem, estrutura e processos**. Universidade Federal Fluminense / CEUFF, Niterói, p.159-193. 1984.
- BARBOSA, M.R.V.; THOMAS, W.W. Biodiversidade, conservação e uso sustentável da Mata Atlântica no Nordeste. In: ARAÚJO, E. de L.; MOURA, A. do N.; SAMPAIO, E. de S.B.; GESTINARI, L.M. de S.; CARNEIRO, J. de M.T. (Ed.). **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**. Recife: UFRPE/ SBB, Imprensa Universitária, 2002. p.19-22.
- CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Embrapa-CNPQ; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 1039 p.
- DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A. WENDLING, A. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa florestal brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453-462. 2012.
- ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 3, n. 1, p. 39-45. 1991.

- FAO. **Ex situ storage of seeds, pollen and in vitro cultures of perennial woody plant species**. Rome: FAO, 83p. (FAO Forestry Paper, n.113). 1993.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995–2000**. Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, São Paulo, 2001.
- GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G.; VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 52-61. 2005.
- KOLLMANN, L. J. C.; FONTANA, A. P.; SIMONELLI, M.; FRAGA, C. N. As Angiospermas ameaçadas de extinção no Estado do Espírito Santo. In: Simonelli M, Fraga CN (org) **Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo**. Vitória, Ipema, pp 108-112. 2007.
- MENEZES, L. F. T.; ARAÚJO, D. S. D. Formações vegetais da Restinga da Marambaia. In **História Natural da Marambaia**. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005. p.67-120.
- MYERS, N., R.A. MITTERMEIER, C.G. MITTERMEIER, G.A.B. FONSECA; KENT. J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p. 853-845. 2000.
- NASCIMENTO, M.C., CORTE, G.N., VALDUJO, P.H. & GUEDES, T.B. 2008. **Pilosidade e espessura de folhas em ambientes sob diferentes incidências de luz na restinga**. Livro do Curso de Campo Ecologia da Mata Atlântica. Disponível em: <ecologia.ib.usp.br/curso>.
- PEREIRA, O. J. Formações pioneiras: restingas. In: **Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo**. SIMONELLI, M. & FRAGA, C. N. (orgs). Vitória, IPEMA, 2007.
- PIMENTEL, T. F.; SILVA, A. G. A população de *Gaylussacia brasiliensis* na vegetação arbustiva aberta na Área de Proteção Ambiental de Setiba, Guarapari, ES. **Natureza on line**, v. 9, p. 76-81. 2011.
- PIRATELLI, A. J.; FRANCISCO, M. R. **Consevação da Biodiversidade**: dos conceito às ações. Technical Books: Rio de Janeiro, 272 p, 2013.

- PROFICE, S. R.; KAMEYAMA, C.; CÔRTEZ, A. L. A.; BRAZ, D. M.; INDRIUNAS, A.; VILAR, T.; PESSOA, C., EZCURRA, C. ; WASSHAUSEN, D. 2014. Acanthaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000033>. Acesso em 18 de Março de 2016.
- SIMÃO, E.; NAKAMURA, A. T.; TAKAKI, M. Época de colheita e capacidade germinativa de sementes de *Tibouchina mutabilis* (Vell.) Cogn. (Melastomataceae). **Biota Neotropica**, v. 7, n. 1, p. 67-73. 2007.
- TABARELLI, M., J.M.C. SILVA; GASCON, C. Forest fragmentation, synergisms and the impoverishment of neotropical forests. **Biodiversity and Conservation**, v.13, p.1419-1425. 2004.
- TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M. ; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n.1, p. 132-138. 2005.

## I CAPÍTULO

### **Caracterização estrutural de frutos, sementes e germinação de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. (Acanthaceae)**

#### **RESUMO**

*Aphelandra nitida* é uma espécie arbustiva, com inflorescências em espiga e flores alaranjadas. Os frutos são do tipo cápsula, com deiscência explosiva, liberando as sementes a longa distância, dificultando os estudos dos frutos e sementes da espécie. Diante da escassez de estudos com espécies de *Aphelandra*, este trabalho objetivou analisar morfológicamente os frutos e sementes, anatomia e histoquímica das sementes e estabelecer um protocolo de desinfestação e testes de germinação de *A. nitida*. O material vegetal foi coletado no bairro Liberdade, São Mateus-ES. Os frutos imaturos foram envolvidos com saco de tule, e as sementes coletadas após a deiscência dos frutos. Foram analisados a morfologia e biometria dos frutos e sementes, análise ultraestrutural, anatomia e histoquímica da semente, e realizado um protocolo de desinfestação das semente, e testados diferentes substratos para germinação. O fruto consiste em uma cápsula loculicida constituída por duas valvas, com uma porção basal estéril e uma porção fértil, contendo quatro retináculos. As sementes têm forma globosa, com irregularidade na base. A testa da semente apresenta ornamentação constituída por protuberâncias tuberculada, também denominadas papilas, em toda a superfície. Anatomicamente observou-se que a semente é exalbuminosa, armazenando as reservas nos cotilédones, sendo oleaginosa, por armazenar apenas lipídeos nos cotilédones. O protocolo de desinfestação realizado evidenciou que hipoclorito de sódio e o tempo de imersão influenciam diretamente na desinfestação e consequentemente na germinação das sementes, visto que no tratamento controle as sementes tiveram 100% de mortalidade devido à infestação fúngica. Recomenda-se a concentração de hipoclorito de sódio a 5% por 30 minutos para desinfestação das sementes de *A. nitida*. Quanto ao substrato, é recomendado a utilização do substrato sobre papel para a germinação de *A. nitida*, por conferir uma série de vantagens em relação aos demais tratamentos testados.

Palavras-chave: Anatomia, Desinfestação, Retináculo, Substrato

## ABSTRACT

*Aphelandra nitida* is a shrub species, with spike inflorescences and orange flowers. The fruits are capsule type, with explosive dehiscence, releasing the seeds at a long distance, making it difficult to study the fruits and seeds of the species. Faced with the scarcity of studies with *Aphelandra* species, this work aimed to analyze the fruits and seeds, anatomy and histochemistry of the seeds, and to establish a protocol for disinfestation and germination tests of *A. nitida*. The vegetable material was collected in the neighborhood Liberdade, São Mateus-ES. The immature fruits were wrapped with a tulle bag, and the seeds collected after fruit dehiscence. The morphology and biometry of the fruits and seeds, ultrastructural analysis, anatomy and histochemistry of the seed, and a disinfestation protocol of the seed were analyzed, and different substrates for germination were tested. The fruit consists of a loculicidal capsule consisting of two valves, with a sterile basal portion and a fertile portion, containing four retinaculum. The seeds have globose shape, with irregularity in the base. The seed features ornamentation consisting of tuberculate protuberances, also called papillae, over the entire surface. Anatomically it was observed that the seed is exalbuminous, storing the reserves in the cotyledons, being oleaginous, for storing only lipids in the cotyledons. The disinfestation protocol showed that sodium hypochlorite and immersion time directly influenced the disinfestation and consequently the germination of the seeds, since in the control treatment the seeds had a 100% mortality due to fungal infestation. It is recommended to concentrate 5% sodium hypochlorite for 30 minutes to disinfestation the *A. nitida* seeds. Concerning the substrate, it is recommended to use the substrate on paper for the germination of *A. nitida*, as it offers a series of advantages over the other treatments tested.

Key-words: Anatomy, Disinfestation, Retinaculum, Substrate

## 1. INTRODUÇÃO

Acanthaceae é tradicionalmente subdividida em três subfamílias: Nelsonioideae, Thunbergioideae e Acanthoideae (SCOTLAND & VOLLESEN 2000), definidas por caracteres moleculares e pelas diferenças na tipologia dos frutos e sementes (HEDRÉN et al., 1995). Acanthoideae, por sua vez, compreende cerca de 95% das espécies da família, apresenta frutos do tipo cápsula loculicida explosiva, sendo caracterizada pela presença de retináculo nos frutos, entendido como uma sinapomorfia que sustenta a monofilia do grupo (MCDADE & MOODY, 1999; DANIEL & MCDADE, 2014). Nela encontram-se aproximadamente 350 espécies, distribuídas em mais de 20 gêneros, destacando-se: *Aphelandra* R. Br. (SCOTLAND & VOLLESEN 2000).

*Aphelandra* compreende cerca de 200 espécies com distribuição neotropical, ocorrendo no México, América Central, região Andina e Brasil (PROFICE & ANDREATA, 2011). Os frutos apresentam uma porção basal estéril, e uma fértil, onde situam-se os retináculos. As cápsulas possuem cerca de 4 sementes com forma subglobosa (WASSHAUSEN, 1975).

Em Acanthaceae o estudo estrutural dos frutos e sementes, bem como os aspectos germinativos das espécies têm sido negligenciados, pela dificuldade de obtenção de sementes maduras, pois o fruto libera as sementes a longa distância (CORNER, 1976; WITZTUM & SCHULGASSER, 1995). Ressalta-se que não obstante à característica deiscente dos frutos, o número de sementes é reduzido em alguns gêneros, como em *Ruellia* L., *Justicia* L. e *Aphelandra* (BARROSO et al., 1999).

Alguns autores assinalam a importância da morfologia e análise ultraestruturais das sementes para a taxonomia da família: Balkwill & Schoonraad (1999) com oito espécies do gênero africano *Peristrophe* Nees; a descrição morfológica das sementes de duas espécies de *Acanthus* L. e uma de *Thunbergia* Retz. ocorrentes no leste e centro da Europa (BOJŇANSKÝC & FARGAŠOVÁ, 2007); Perissé et al. (2011) com *Dicliptera squarrosa* Ness, Indriunas et al. (2014) com análise da microescultura de uma nova espécie nativa de *Herpetacanthus* Nees, o trabalho de Keil & McDade (2014) com a morfometria e microescultura de espécies do clado Mirandea (Justicieae) ocorrente na América Central e o trabalho de Aoyama et al. (2015) de caracterização de frutos e sementes de *Justicia scheidweileri* V.A.W. Graham, sendo ausentes estudos nesta área com as espécies de *Aphelandra* R. Br.



Estudos do tamanho, forma e tipo de deiscência dos frutos, são caracteres imprescindíveis para a identificação, classificação taxonômica das Angiospermas (BARROSO et al., 1999), e do ponto de vista ecológico, a morfologia de sementes pode ser bastante útil em estudos de conservação da flora (KUNIYOSHI, 1983).

Vários autores salientam a importância dos caracteres morfoanatômicos das sementes, uma vez que o tamanho dessas estruturas é indispensável para que se possa conhecer melhor determinada espécie (CORNER, 1976; RAVEN et al., 2007). Nas espécies do gênero *Aphelandra* os estudos anatômicos da semente e principal composição química ainda não estão definidos. O conhecimento da principal substância de reserva da semente pode auxiliar no entendimento de vários processos fisiológicos inerentes ao desenvolvimento inicial da plântula, bem como na sua propagação em outras regiões brasileiras (CARVALHO & NAKAGAWA, 2012). Simultaneamente à anatomia os métodos histoquímicos vêm sendo utilizados há algum tempo para detecção de compostos estruturais, de reserva e do metabolismo secundário no interior da planta, mostrando-se uma importante ferramenta para estudos ecológicos, fisiológicos e taxonômicos (FANK-DE-CARVALHO & GRACIANO-RIBEIRO, 2005).

Atrelado aos estudos morfológicos, os aspectos germinativos da semente é de fundamental importância tanto para a compreensão do estabelecimento de uma comunidade vegetal, como para a sobrevivência e regeneração natural das espécies (JUNQUEIRA et al., 2008). Porém poucos trabalhos são realizados objetivando definir metodologias adequadas para avaliar a capacidade de germinação de espécies nativas.

*Aphelandra nitida* Ness & Mart. é uma espécie endêmica da costa Atlântica brasileira, distribuindo-se na faixa litorânea de forma contínua desde o estado de Alagoas até o Espírito Santo, ocorrendo também em Matas de Restinga (PROFICE, 97/98). É uma espécie arbustiva, com inflorescências em espiga e flores alaranjadas (NEES VON ESSENBECK & MARTIUS, 1823), e com florescimento ao longo de todo ano. Os frutos são do tipo cápsula, verdes quando imaturo e marrom escuro quando maduros (PROFICE, 97/98). Os trabalhos morfológicos com a espécie são escassos, e se concentram em trabalhos taxonômicos (PROFICE, 97/98).

Diante da escassez de estudos com a espécie, este trabalho objetivou analisar morfológicamente os frutos e sementes, histoquímica da semente e estabelecer um protocolo de desinfestação e testes de germinação de *A. nitida*, e a fim de fornecer

subsídios taxonômicos, filogenéticos, ecológicos, e morfológicos para a família Acanthaceae.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local de Coleta**

A espécie *Aphelandra nitida* Ness & Mart. foi coletada no bairro Liberdade, município de São Mateus, norte do estado do Espírito Santo (S 18° 45'22.1'' W 039° 48' 53.6''), encontrada em uma área de Mata de Restinga. O local possui relevo plano e é constituído por vegetação arbórea, herbáceas e gramíneas. O solo é constituído por depósito arenoso aluvial de origem fluvio-marinhas (NIMER, 1989). O clima é caracterizado como quente e úmido e a temperatura média anual é de 24,1°C, com as médias máximas variando entre 28,0° e 31,0°C e as médias mínimas 18,0° a 22,0°C no inverno. O índice de precipitação pluviométrica média anual é de 1.313 mm (PROATER, 2011).

### **2.2 Material Vegetal**

Os frutos maduros foram coletados no período de junho a dezembro de 2015. As identificações botânicas foram realizadas por especialistas da Universidade Federal do Espírito Santo. O material fértil testemunho da entidade biológica foi coletado e depositado no herbário VIES (29855).

Para obtenção das sementes, foram selecionados 130 indivíduos adultos, nos quais os frutos ainda imaturos foram envolvidos com sacos de tule (poliamida) de aproximadamente 10,0 x 8,0 cm e envolvidos com arames (Fig. 1A-C), segundo a metodologia proposta por Lima (2012).

Os sacos de tule foram retirados após a deiscência dos frutos (Fig. 1D). As sementes foram armazenadas em envelopes de papel e condicionadas em refrigerador a 8°C por 15 dias para realização do protocolo de desinfestação e estudos morfológicos e biométricos dos frutos e sementes.

Para realização do experimento de germinação, as sementes foram coletadas e conduzidas para o Laboratório de Botânica do Centro Universitário Norte do Espírito Santo, para serem utilizadas no experimento.



**Figura 1-** Coleta dos frutos e sementes de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. (A) Frutos imaturos envolvido por sacos de tule (poliamida); (B) Preparação das armadilhas; (C) Frutos de diferentes indivíduos envolvidos por sacos de tule, como indicado pela seta amarela; (D) Coleta dos frutos e sementes maduros.

### 2.3 Caracterização estrutural dos frutos e sementes

Para o estudo da morfometria dos frutos foram utilizados 100 exemplares maduros, utilizando paquímetro digital com precisão de 0,01 mm. Foram avaliados os seguintes parâmetros: comprimento (total, porção basal estéril, porção fértil, retináculo), espessura e largura (Fig. 2A-B). Para a descrição foi empregada a terminologia adotada por Graham (1988) e Ezcurra (1993).

Para a biometria das sementes foram empregados 100 exemplares, utilizando paquímetro digital com precisão de 0,01 mm. Os seguintes parâmetros foram avaliados: comprimento, largura e espessura da região mediana (Fig. 2C). O comprimento foi considerado como a maior distância entre as extremidades da semente. A descrição

morfológica das sementes foi realizada segundo a terminologia de Bhojwani & Bhatnagar (1974), Groth & Liberal (1988) e Graham (1988), avaliando-se a forma, ápice, base, contorno, superfície, cor e presença de partes associadas.

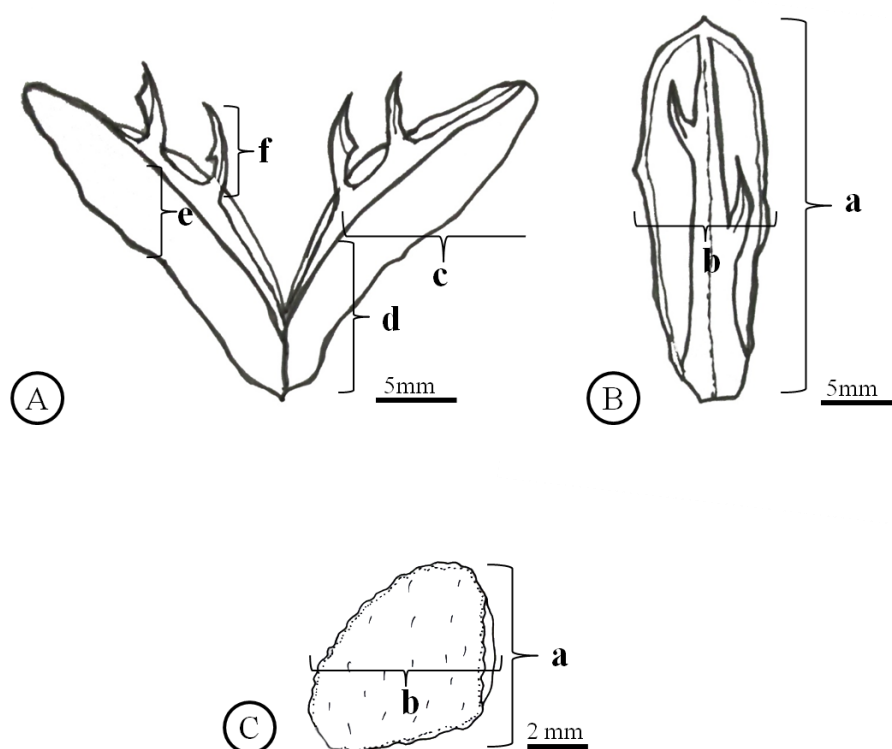
Para a descrição da microescultura da testa, as sementes de *A. nitida* foram fixadas em FAA 50 (JOHANSEN, 1940), e após desidratação em série etílica, as amostras foram secas ao ponto crítico, fixadas em suporte de alumínio com fita dupla face de carbono e metalizadas com uma camada de ouro de 5nm a 1,5 mm no equipamento modelo Quorum – Q 150TE.

As análises e a digitalização das imagens foram realizadas ao microscópio eletrônico de varredura modelo Zeiss – EVO LS15, com as escalas impressas diretamente nas eletromicrografias. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Física e Química (DFQ) da Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” (UNESP) campus de Ilha Solteira.

A estatística descritiva foi utilizada para avaliar o comportamento médio e a variabilidade dos dados amostrais de cada um dos parâmetros analisados. Testou-se a normalidade dos dados para cada parâmetro avaliado pelo teste de Shapiro-Wilk ao nível de 5% de significância. Os dados foram analisados com auxílio do programa estatístico Assistat versão 7.7 beta.

#### **2.4 Testes histoquímicos das sementes**

Foram realizadas secções transversais da região mediana da semente madura, utilizando-se material fresco. As secções foram obtidas à mão livre com auxílio de lâmina de barbear e isopor. Para os testes histoquímicos, foram utilizadas secções transversais do material fresco e logo em seguida tratados com: Sudan IV para detecção de lipídeos totais (JOHANSEN, 1940), solução de Lugol (Iodo e iodeto de potássio) para de amido (JOHANSEN, 1940) e solução de Hidróxido de potássio + Sulfato de Cobre II (reação “Biuret”) para marcação de proteínas (PURVIS et al., 1964), sendo realizados tratamentos controles para cada teste. Lâminas temporárias foram montadas com as soluções de cada teste.



**Figura 2-** Esquemas do fruto e semente de *A. nitida* Ness & Mart., indicando as regiões mensuradas. (A) Fruto aberto; (B) Valva vista internamente; (C) Semente. a = comprimento, b = largura, c = comprimento da porção fértil, d = comprimento da porção estéril, e = espessura, f = comprimento do retináculo.

## 2.5 Protocolo de desinfestação

Para o estabelecimento do protocolo de desinfestação, foram selecionadas 150 sementes de *Apheladra nitida*, distribuídas em cinco tratamentos: controle, no qual as sementes foram lavadas em água destilada por 30 min; solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 15 min sob agitação; solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 min sob agitação; solução de hipoclorito de sódio a 5% por 15 min sob agitação; solução de hipoclorito de sódio a 5% por 30 min sob agitação.

O experimento foi inteiramente casualizado, contendo três repetições de dez sementes por tratamento. Após a desinfestação as sementes foram distribuídas em placas de Petri contendo duas folhas de papel filtro umedecidas com 2,5 vezes o peso do papel (BRASIL, 2009). As amostras foram acondicionadas em câmaras de germinação tipo BOD, 25°C, com fotoperíodo de 12/12 h, sendo umedecidas em dias intercalados.

As sementes foram observadas diariamente, para análise do tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG). O efeito da desinfestação foi observado no 30º dia de semeadura. Foram consideradas como germinadas as sementes que tiveram a emergência da raiz primária (1 mm) ou qualquer parte da planta. Os resultados foram analisados a partir de cálculos de porcentagem final (%G), o TMG e a VMG segundo a fórmula proposta por Labouriau (1983):

Porcentagem de Germinação =  $\Sigma n_i / N \times 100$ , onde  $n_i$  é o número de sementes germinadas e  $N$  é o número de sementes colocadas em cada placa. Tempo médio de germinação =  $\Sigma (n_i \times t_i) / \Sigma n_i$ , onde  $n_i$  é o número de sementes germinadas em cada dia e  $t_i$  é o dia em que estas germinaram. Velocidade média de germinação:  $V_m = 1/t$ ,  $t$ : Tempo médio de germinação.

A porcentagem de germinação foram transformadas em arco-seno para normalização dos dados. Os parâmetros seguiram para análise de variância (ANOVA) e quando os dados não seguiram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, foram transformados com  $x = \sqrt{x}$ , em seguida passaram pelo teste Tukey, com  $p = 5\%$ , no programa estatístico Assisat 7.7 beta.

## **2.6 Germinação**

As sementes foram submetidas a cinco tratamentos de germinação todas desinfestadas com hipoclorito de sódio à 5% por 30 minutos sob agitação: I- Sobre papel: as sementes foram semeadas em placa de Petri contendo duas folhas de papel filtro. II- Entre papel: as sementes foram colocadas em placas de Petri com duas folhas de papel filtro, e cobertas novamente com duas folhas de papel filtro, a fim de aumentar a superfície de contato com o substrato. III- Substrato areia lavada: as sementes foram enterradas em placa de Petri contendo substrato areia lavada. IV- Substrato vermiculita: as sementes foram enterradas em placas de Petri contendo cerca de 300 g de substrato vermiculita expandida.

Para cada tratamento foram utilizadas 50 sementes, com cinco repetições por tratamento, contendo 10 sementes em cada placa de Petri. Para os tratamentos onde utilizou-se substrato de papel filtro, este foi umedecido cerca 2,5 vezes seu peso com água destilada (BRASIL, 2009).

O experimento finalizou-se em janeiro de 2016, totalizando 60 dias. Foram consideradas como germinadas as sementes que tiveram a emergência da raiz primária (1 mm) ou qualquer parte da planta. Os resultados foram analisados a partir de cálculos de porcentagem final (%G), o tempo médio de germinação (TMG) e a velocidade média de germinação (VMG) segundo a fórmula proposta por Labouriau (1983):

Porcentagem de Germinação =  $\Sigma n_i / N \times 100$ , onde  $n_i$  é o número de sementes germinadas e  $N$  é o número de sementes colocadas em cada placa. Tempo médio de germinação =  $\Sigma (n_i \times t_i) / \Sigma n_i$ , onde  $n_i$  é o número de sementes germinadas em cada dia e  $t_i$  é o dia em que estas germinaram. Velocidade média de germinação:  $V_m = 1/t$ ,  $t$ : Tempo médio de germinação.

A porcentagem de germinação foi transformada em arco-seno para normalização dos dados. Os parâmetros seguiram para análise de variância (ANOVA) e quando os dados não seguiram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, foram transformados com  $x = \sqrt{x}$ , em seguida passaram pelo teste Tukey, com  $p = 5\%$ , no programa estatístico Assistat 7.7 beta.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização estrutural dos frutos e sementes

O fruto de *Aphelandra nitida* consiste em uma cápsula loculicida constituída por duas valvas, com uma porção basal estéril e uma porção fértil, também relatado por Graham (1988) para espécies de *Justicia* L. Os frutos são secos de coloração castanho escuro, não contém brilho ou pilosidade, apresentando um aspecto fibroso (Fig. 3A-D), sendo encontrado irregularidades na sua forma. Segundo Barroso et al. (1999), estes frutos se enquadram no do tipo 3, tipo mais aperfeiçoado de cápsulas, devido à clara distinção entre as porções estéril e fértil, encontrados também em *Justicia*, *Ruellia* e *Pseuderanthemum*.

Apresentam quatro estruturas denominadas retináculo ou ejaculador (Fig. 3B), situadas duas em cada valva do fruto, onde as sementes estão assentadas. Essa estrutura é formada pelo crescimento do funículo ao lado da micrópila, auxiliando na liberação da semente (CORNER, 1976; WITZTUM; SCHULGASSER, 1995; BARROSO et al., 1999). Cerca de 95% das espécies de Acanthaceae (as pertencentes a subfamília

Acanthoideae), apresentam frutos secos indeiscentes tipo cápsula loculicida, com retináculos, restringindo-se para as espécies da subfamília Thunbergioideae e Nelsonoideae (SCOTLAND; VOLLESEN, 2000), no qual não estão presentes retináculos, e alguns representantes da família Thunbergioideae, mais especificamente representantes do gênero *Mendoncia* Vell ex Vand, que apresentam frutos do tipo drupóide indeiscentes (BARROSO et al., 1999; SCOTLAND; VOLLESEN, 2000).

Os trabalhos morfológicos e biométricos de frutos referentes ao gênero *Aphelandra* são escassos. Abordagens superficiais são retratadas em trabalhos de descrições de espécies, como apresentado por Wasshausen (1975) para *Aphelandra knappii*, *A. davidsonii* e *A. schunkei*, que apresentam fruto do tipo cápsula clavada verde, com cerca de 12 a 15 mm de comprimento, 4 a 5 mm de largura. Para grande parte das descrições das espécies do gênero, assim como para *A. nitida*, poucas são as informações sobre a morfologia dos frutos, devido à ausência do material para análise, restringindo-se apenas as descrições da flor e inflorescência.

Na tabela 1 é apresentada a estatística descritiva para os parâmetros morfológicos dos frutos. Os valores médios do comprimento total, comprimento da parte fértil, e da porção estéril do fruto, apresentaram os maiores valores de desvio padrão, não apresentando distribuição normal apenas para o parâmetro comprimento total. Esse fato pode estar relacionado com a irregularidade no formato do fruto. Aoyama et al. (2015) também relataram irregularidades no formato do fruto de *J. scheidweileri*, onde as maiores diferenças foram encontradas para o parâmetro largura. Para os demais parâmetros avaliados, os valores de desvio padrão apresentaram-se relativamente baixos quando comparados aos valores das médias, podendo indicar uma pequena variabilidade dos frutos.

Foram encontrados quatro sementes por fruto. O número de semente por fruto em Acanthaceae é variável, podendo ser elevado como em *Staurogyne* Wall. (25 a 30), *Elytraria* Michx. (12 a 16), e *Hygrophila* A. Br. (12 a 18) ou reduzido como em *Aphelandra* R. Br. (4), *Dicliptera* Juss. (4) e *Lepidagathis* Willd. (4) (WASSAHUSEN; WOOD, 2004). Alguns frutos apresentaram uma semente reduzida na porção inferior (Fig. 3D). Barroso et al. (1999) relatam que para o gênero *Justicia* L. os frutos apresentam algumas modificações, onde a porção do terço médio-inferior é estéril, restando apenas duas sementes.



As sementes de *A. nitida* têm forma globosa, com irregularidade na base, apresenta ápice acuminado, base assimétrica na região da micrópila, contorno ovado, superfície tuberculada, com projeções irregulares observável em estereomicroscópio (Fig. 3E). Apresenta faces com formas distintas, sendo plana a face aderida à parede do fruto e triangular a face aderida ao retináculo (Fig 3F). São bitegumentadas, com tegumento externo castanho contendo ornamentação na parede, e tegumento interno branco. As sementes não apresentam endosperma, sendo uma característica comum para alguns gêneros da família, como *Justicia* L. e *Ruellia* L. (BARROSO et al., 1999).

**Tabela 1-** Estatística descritiva das dimensões dos frutos maduros de *Aphelandra nitida* Ness & Mart.

Parâmetros (mm)	Média	Desvio Padrão	Valor máximo e mínimo	Distribuição Normal
<b>Comprimento Total</b>	27,20	2,66	20,41; 31,01	Não
<b>Comprimento da porção fértil</b>	20,08	2,63	14,00; 24,71	Sim
<b>Comprimento da porção estéril</b>	8,22	2,37	3,78; 10,69	Sim
<b>Comprimento do Retináculo</b>	1,47	0,69	0,43; 2,38	Sim
<b>Largura</b>	7,60	0,73	6,60; 9,09	Sim
<b>Espessura</b>	3,75	0,55	2,81; 4,93	Sim

\* Teste de normalidade Shapiro-Wilk (W) para  $p < 0,05$

Assimetria na base da semente é comumente retratada para as espécies de Acanthaceae, como para *Justicia scheidweileri* V.A.W. Graham (Aoyama *et al.*, 2015), *Dicliptera squarrosa* Ness (PERISSÉ et al., 2011), sendo relatado por Graham (1988) como características das espécies pertencentes às secções do Novo Mundo.

A metodologia de coleta das sementes proposta por Lima (2012), com a utilização de sacos feitos de tule, foi extremamente efetiva, uma vez que os frutos apresentam cápsulas com deiscência explosiva, ejetando as sementes a longas distâncias, e um número reduzidos de sementes, onde foi possível através do método coletar cerca de 1000 sementes em um período de sete meses. O período de coleta das sementes foi relativamente longo, pois a espécie apresenta dispersão assincrônica, ou seja, a dispersão ocorre em um período mais longo, também descrito para outras espécies da família no trabalho de Lima (2012).

Em microscopia eletrônica de varredura, a testa da semente apresenta ornamentação constituída por protuberâncias tuberculada, também denominadas papilas, em toda a superfície (Figura 4A-G) incluindo a margem (fig. 5E), distribuindo-se principalmente em fileiras. A distinção das duas faces da semente é claramente observada ao olho nu, sendo evidenciada em microscopia eletrônica de varredura, apresentando uma face lisa (fig. 4A-B) e a outra com aspecto triangular (fig. 4C-D).

A distribuição das papilas do tegumento de forma aleatória ou em fileira é uma importante característica para diferenciação de grupos taxonômicos. Al-Hakimi et al. (2015), utilizaram a distribuição das papilas para diferenciar espécies de *Hypoestes* Sol. ex R.Br. e *Rinacanthus* Ness, que também são gêneros de Acanthaceae.

Graham (1988) propôs tipos morfológicos da testa para sementes de *Justicia* L., sendo adaptados para descrições das sementes de outros gêneros da família. Dentre os tipos propostos, o que mais se assemelha para *A. nitida* é o Tipo A, subtipo 4 (aveolado, ruguloso ou tuberculado-Ruguloso-tuberculado com ápices dos sulcos ou tubérculos arredondados). Além disso, apresentam pequenas depressões localizados em toda superfície (fig. 4F-G), sendo visualizados apenas em MEV.

A presença de tegumento com protuberâncias e projeções irregulares, também foi retratado para as espécies de *Aphelandra hirta* e *A. prismatica* no trabalho de Azevedo et al. (2013) que analisaram as microestruturas dos grãos de pólen e de sementes de Acanthaceae, em *Herpetacanthus chalarostachyus* Indriunas & Kameyama por Indriunas et al. (2014), e Al-Hakimi et al. (2015) para as espécies *Rhinacanthus scoparius* e *Hypoestes triflora*. A presença de projeções e pontuações na epiderme pode estar atribuída a um controle da temperatura superficial, pois permitem acúmulo de água, principalmente em sementes, que não podem fazê-lo através da transpiração (BARTHLOTT, 1981).

A microescultura da testa apresenta-se como importante caráter taxonômico para delimitação da família, como demonstrado em *Peristrophe* Ness (BALKWILL et al., 1986), *Ruellia* L. (EZCURRA, 1993), *Justicia* L. (GRAHAM, 1988; PEICHOTO, 1998), *Thumburgia* (BALKWILL; CAMPBELL-YOUNG 1999), e sendo apontada como a principal característica de diferenciação taxonômica em gêneros da tribo Justicieae (GRAHAM, 1988).

Nos dados biométricos das sementes, representados na tabela 1, os valores de desvio padrão mostraram-se relativamente baixos quando comparados com os valores das médias, apresentando distribuição normal para todos os parâmetros avaliados, o que indica pequena variabilidade das sementes, assim como observado nos valores máximo e mínimo, havendo pouca discrepância.

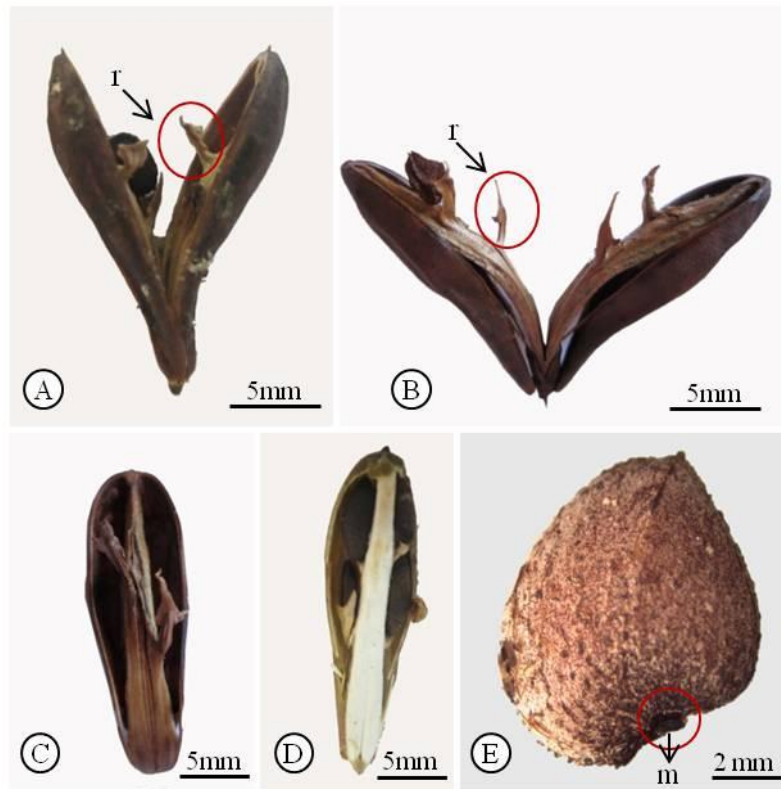
Lima (2012) também relatou desvio padrão baixo para o comprimento, largura e espessura das sementes de *Justicia lanstyakii* Rizz, *Ruellia nitens* (Ness) Wassh., *R. incompta* (Ness) Lindau. Aoyama *et al.* (2015) mencionaram para *J. scheidweileri* resultados congruentes aos relatados no presente estudo, onde as sementes apresentaram baixa variabilidade biométrica, destacando a importância de padronização dos dados e coleta de frutos maduros contendo as sementes. Segundo estes autores, o emprego de estruturas imaturas, principalmente as sementes, pode acarretar em acentuadas diferenças morfológicas dentro de uma mesma espécie. Um importante fato relatado pelos autores, é que muitos espécimes de materiais herborizados apresentam seus frutos imaturos abertos durante o processo de secagem, ressaltando a incerteza do grau de maturidade das sementes encontradas em exsicatas.

Análise biométrica dos frutos e sementes vem se tornando cada vez mais importante, como mostra os trabalhos de Aoyama *et al.* (2015) que avaliaram a morfologia e biometria de frutos e sementes de *J. scheidweileri* e Keil & McDade (2014) com sementes do clado *Mirandea* (Justicieae). Desta forma, a obtenção de frutos e sementes maduras e a análise acurada destes materiais pode ser uma importante contribuição para o entendimento do gênero.

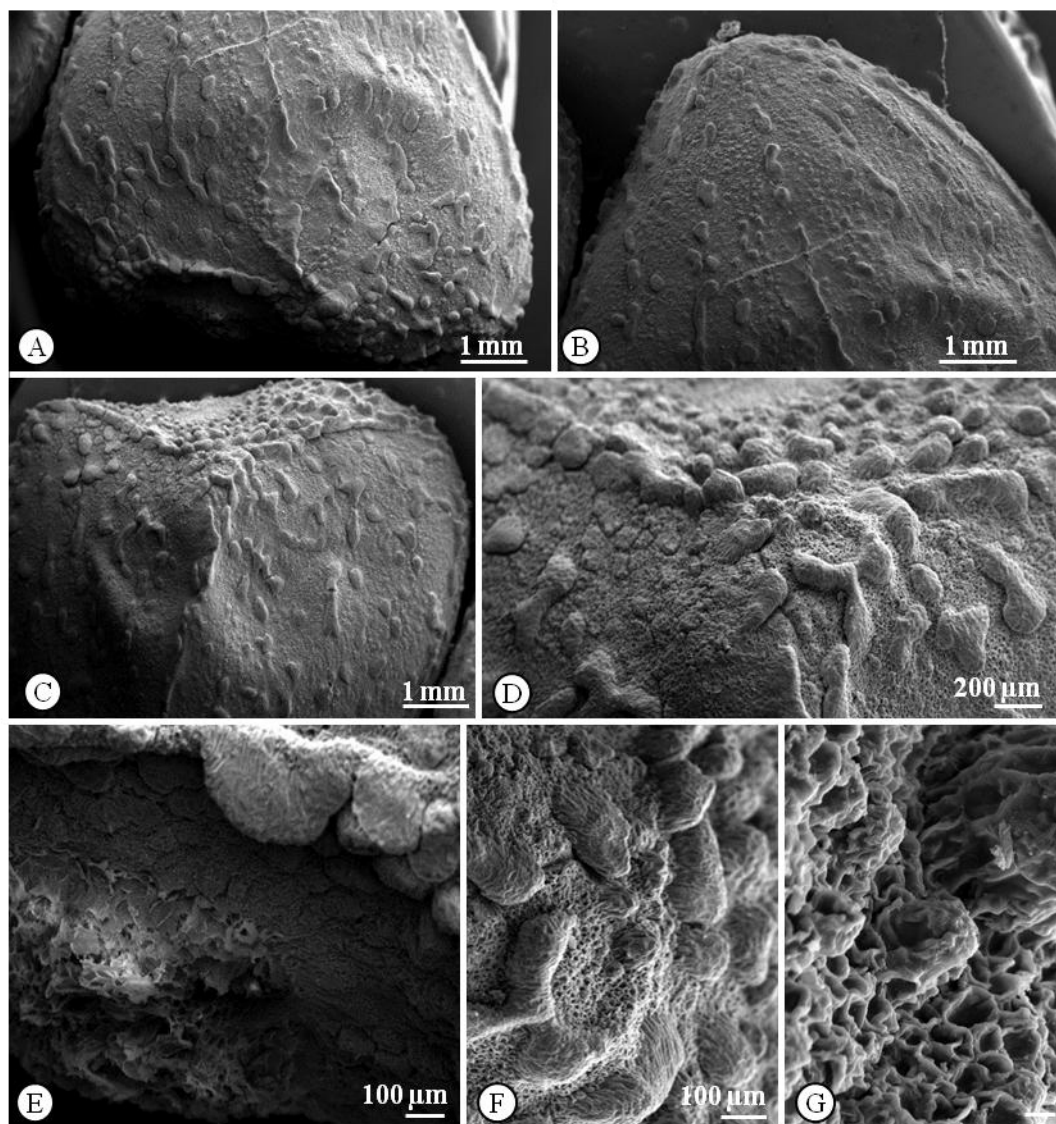
**Tabela 2.** Estatística descritiva das dimensões das sementes maduras de *Aphelandra nitida* Ness & Mart.

Parâmetros (mm)	Média	Desvio Padrão	Valor máximo e mínimo	Distribuição Normal
<b>Comprimento</b>	6,53	0,46	7,25; 5,49	Sim
<b>Largura</b>	5,03	0,43	5,79; 4,16	Sim
<b>Espessura</b>	3,07	0,37	4,44; 2,71	Sim

\* Teste de normalidade Shapiro-Wilk (W) para  $p < 0,05$



**Figura 3-** Fruto e semente de *A. nitida* Ness & Mart. (A) Fruto aberto; (B) Valva vista internamente; (C) detalhes das porções fértil e estéril da valva. (D) Fruto visto internamente mostrando as sementes assentadas no retináculo (E) Semente. r= retináculo; m= micrópila.



**Figura 4-** Semente de *A. nitida* Ness & Mart. em Microscopia Eletrônica de Varredura. (A) Base da semente, evidenciando a assimetria; (B) Detalhe do ápice, apresentando a distribuição das papilas epidérmicas em fileiras; (C) Detalhe da face superior da semente, com enfoque no aspecto triangular; (E) Detalhe da margem, (F) Microescultura da testa evidenciando protuberâncias de aspecto ruguloso-tuberculado. (G) Detalhe da superfície da testa e das pequenas depressões epidérmicas.

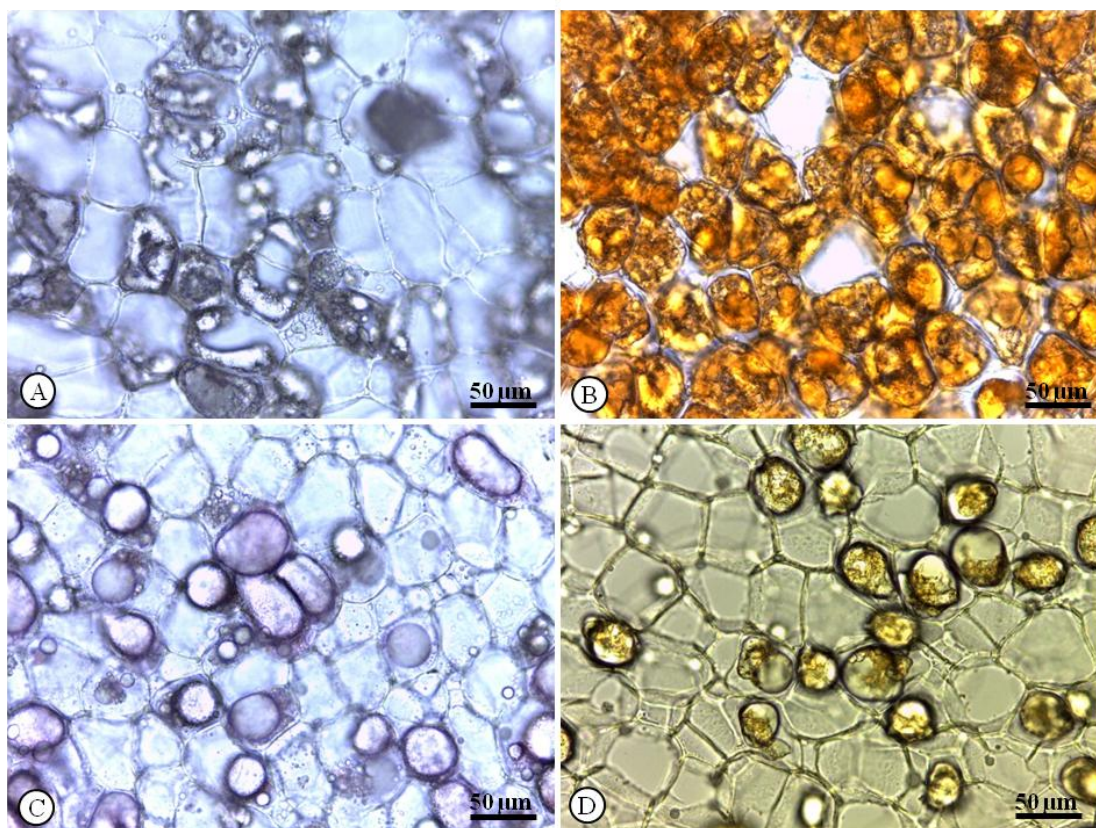
### 3.2 Testes histoquímicos da semente

Os testes histoquímicos das secções tratadas com os reagentes evidenciaram a presença de lipídeos sob a forma de gotículas dispersas nos cotilédones, devido à reação positiva ao Sudan IV (fig. 6B), o que pode classificá-la como semente oleaginosa. Os testes para os demais compostos (proteínas e amido) (fig. 6C-D) foram negativos para todas as regiões amostradas. O conhecimento da anatomia e o principal conteúdo de reserva da semente é importante para avaliar o vigor e o potencial de armazenamento da

semente (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Segundo Cavalcanti (2011) o óleo é uma das substâncias lipídicas sintetizadas pelas plantas e armazenadas em maiores proporções nas sementes, constituindo-se em fonte de energia necessária ao processo da germinação.

Corte et al. (2006) sugerem que espécies com alto teor de lipídeos consigam se estabelecer em ambientes menos iluminados graças ao maior conteúdo energético armazenado nas sementes, como no caso de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. Kitajima (1996) relatou que o alto conteúdo lipídico em sementes de algumas espécies deve indicar uma seleção compensatória (maior energia/ volume), à medida que as sementes mais leves são fortemente selecionadas, por exemplo, para melhor dispersão. Isso se enquadra para a espécie em estudo, que apresenta um mecanismo próprio de dispersão (autocoria), sementes pequenas, se estabelecem em ambientes com pouca incidência luminosa e apresentam elevado teor lipídico em seus cotilédones.

Esau (1974) relata que o produto comum de reserva nos cotilédones das sementes é o amido, sendo menos encontrados reservas de óleo. Tanto reservas de lipídeo quanto de amido possuem a mesma função na semente, reserva energética para o embrião, porém, o estudo do conteúdo de reserva da semente é de extrema importância, principalmente em relação às características físicas, longevidade e armazenamento. Sementes amiláceas, por exemplo, apresentam maior longevidade quando comparadas às sementes oleaginosas, se armazenadas sob as mesmas condições (ZANON; RAMOS, 1986).



**Figura 5-** Secções transversais dos cotilédones da semente de *Aphelandra nitida* Ness & Mart., evidenciando o resultados dos testes histoquímicos para constatação do tecido de reserva. (A) Tratamento controle, sem adição de reagente; (B) Secção tratada com Sudam IV evidenciando a presença de lipídeos; (C) Secção tratada com Solução de Hidróxido de potássio + Sulfato de Cobre II, demonstrando a reação negativa para proteína; (D) Secção tratada com solução de Lugol, caracterizando reação negativa para amido.

### 3.3 Protocolo de desinfestação

Foi observada diferença significativa entre os tratamentos de desinfestação das sementes. No tratamento controle realizado (sem utilização de produto químico), foi constatado a morte de todas as sementes, acarretada pela alta incidência de fungos, levando a necrose dos tecidos. Isso indica a necessidade de utilizar a imersão em solução de hipoclorito de sódio para minimizar a ocorrência de contaminantes fúngicos nas sementes de *A. nitida*.

Nos dois tempos de imersão (15 e 30 minutos), e nas duas concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO) 2,5 e 5%, foi possível observar uma considerável descontaminação das sementes. A germinação foi máxima no tratamento NaClO 5% 30 min, apresentando diferenças significativas dos demais tratamentos. As menores



porcentagens ocorreram nos tratamentos NaClO 5% 15 min (76,6%), e 5% 30 min que obtiveram a mesma porcentagem (93,3%) como mostra a tabela 4. No entanto, os tempos de 30 min causaram um aumento no tempo médio de germinação (TMG), uma vez que seus valores (62,4; 64,6 dias) foram menores em 15 min (55,5; 56,1 dias).

**Tabela 3-** Efeito da concentração de Hipoclorito de Sódio (NaClO) e do tempo de imersão, na porcentagem, tempo médio e velocidade média de germinação para sementes de *Aphelandra nitida* R. Br.

Tratamentos	Germinação (%)	Tempo Médio de Germinação (dias)	Velocidade Média de Germinação (h <sup>-1</sup> )
NaClO 2,5% 15 min	93,3 ab	55,5 b	0,015 a
NaClO 2,5% 30 min	93,3 ab	62,4 a	0,017 a
NaClO 5% 15 min	76,6 a	56,1 b	0,016 a
NaClO 5% 30 min	100 b	64,6 a	0,017 a

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.

A efetividade dos tratamentos de descontaminação depende da substância usada, da concentração e dos períodos de exposição do explante aos agentes, além de ser dependente do nível de tolerância da espécie a esses produtos (HARTMANN et al., 2002). Os produtos químicos mais comumente utilizados na desinfestação das sementes são os compostos à base de cloro, como o hipoclorito de sódio (NaClO) em várias concentrações de cloro ativo, tanto para espécies herbáceas, quanto arbóreas (PEREIRA et al., 2011; BEVILACQUA et al., 2011).

Os trabalhos com germinação e desinfestação de sementes de Acanthaceae são restritos. Alguns estudos de germinação com espécies da família mostram que as sementes foram desinfestadas com protocolos semelhantes ao utilizado no presente trabalho, tais como *Andrographis paniculata* Nees que foram descontaminadas com hipoclorito de sódio a 5% por 20 min (PRATHANTURARUG et al., 1996), *Eranthemum nervosum* (Vahl) R. Br., cujas sementes foram desinfestadas com 20% de água sanitária (Clorox) por 15 minutos (SURANINPONG; TE-CHATO, 2010), e Lima (2012) que sugere a desinfestação de *Justicia lanstykii* Rizz, *Ruellia nitens* (Ness) Wassh. e *Ruellia incompta* (Ness) Lindau com hipoclorito comercial por no mínimo 15 minutos.



A germinação máxima das sementes no tratamento de desinfestação NaClO 5% 30 minutos, pode estar associada à ação do hipoclorito de sódio no tegumento da semente. Segundo Noletto et al. (2010) a ação do NaClO durante a descontaminação, pode retirar quimicamente as barreiras de embebição da semente, relatando que a cutícula das sementes de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) foi removida parcialmente pelo hipoclorito, reduzindo o tempo de embebição da semente quando comparada aos tratamentos de menor tempo de imersão. No trabalho de Lima (2012) relatou que para *Ruellia nitens* a germinação das sementes foi maior no tratamento de desinfestação com hipoclorito de sódio por 15 minutos quando comparado ao mesmo tratamento por 5 minutos.

No estudo de BEVILACQUA et al. (2011) utilizando sementes de calêndula, conseguiram a desinfestação das sementes usando hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 minutos, o mesmo foi observado por Nogueira et al. (2010) que testando a desinfestação de sementes de *Petiveria alliacea* L., verificaram a maior descontaminação quando as sementes eram submetidas ao tratamento com hipoclorito de sódio em maior concentração (0,6%), demonstrando a importância desse agente na assepsia de sementes.

De acordo com Ferreira & Borghetti (2004) o tempo médio de germinação (TMG) permite inferir sobre a velocidade de germinação (VMG), uma vez que se refere ao tempo médio necessário para que um conjunto de sementes germinem. Os tratamentos com maior tempo de imersão no hipoclorito de sódio, podem ter acarretado lesões no tecido embrionário causando um aumento no TMG, e consequentemente menor VMG como relatado por Lima (2012) em *R. nitens* em 30 minutos de hipoclorito de sódio (5,1 dias). Essa mesma autora também relatou que para *R. imcompta*, não houve alteração da porcentagem de germinação, nem o tempo médio de germinação em relação ao tempo de imersão na solução de hipoclorito em todas as concentrações testadas (2,5 e 5%). Já em *J. lanstyiakii* houve redução do tempo médio de germinação em relação ao aumento do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio.

O estabelecimento de um protocolo de desinfestação é de extrema importância para germinação da semente, principalmente em experimentos controlados, pois proporcionam assepsia e qualidade das plântulas geradas, tolerância a pragas ou doenças, entre outras (MAMEDES; SILVA, 2010). A estrutura do tegumento da

semente varia entre espécies, pois reagem de maneiras diferentes na germinação e tempo médio de germinação, frente ao tempo de imersão no hipoclorito de sódio, como observado no trabalho de Lima (2012), que mesmo trabalhando com duas espécies de *Ruellia* L., estas apresentaram diferenças na germinação e tempo médio de germinação, no mesmo tempo de imersão no hipoclorito de sódio.

### 3.4 Germinação

Na Tabela 4 encontra-se a análise de variância da porcentagem, tempo médio (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) de sementes de *A. nitida* em diferentes substratos. Através dos resultados, verifica-se a influência direta do substrato na porcentagem de germinação, devido às diferenças significativas encontradas. A maior porcentagem de germinação foi encontrada no substrato sobre papel de filtro (72%), seguida do entre papel (58%), areia (30%) e por último o substrato vermiculita (8%).

Quanto ao TMG, os menores valores foram encontrados para as sementes germinadas em substratos vermiculita e areia, todavia, não houve diferenças significativas entre os diferentes substratos. O tempo médio de germinação ( $t$ ) é um indicativo da velocidade do processo germinativo e pode ser usado conforme o proposto por Ferreira et al. (2001) para classificar as sementes em três categorias: com germinação rápida ( $< 5$  dias), germinação com valores intermediários ( $5 < t < 10$  dias) e por último aquelas com germinação lenta ( $> 10$  dias). Considerando essa classificação, *A. nitida* pode ser considerada uma espécie de germinação lenta, visto que levaram cerca de 40 a 50 dias para iniciar a protrusão radicular.

Segundo Alagesaboopathi (2013) a germinação das sementes de *Andrographis elongata* T. And. (Acanthaceae) iniciou-se em 12 dias, também considerada uma espécie de germinação lenta. Já as sementes de *Andrographis paniculata* Nees foram germinadas com sucesso logo após três dias de semeadura, sendo utilizados métodos de quebra de dormência, atingindo até 72% de germinação (TELEI et al., 2012). Bhattacharya et al. (2012) também constataram o início da germinação de *A. paniculata* após 4 dias de incubação, não relatando dormência para a espécie.

O retardo no tempo médio de germinação pode estar relacionado ao conteúdo de reserva das sementes. Em sementes oleaginosas (como abordado no item 3.2), a forma de carbono estocada encontra-se na forma de gorduras ou óleos, que para serem

utilizados, devem primeiramente ser convertido em açúcares, para posteriormente serem usados na respiração celular e no processo de germinação da semente como fonte energética para o estabelecimento da plântula (SERT et al., 2009).

A Velocidade Média de Germinação não diferiu estatisticamente entre os tratamentos. Em todos os tratamentos os valores obtidos foram muito baixos devido ao elevado Tempo de Germinação (TMG). O cálculo da velocidade é o inverso do tempo médio de germinação, ou seja, quanto maior for o TMG, menor será a VMG (FERREIRA; BORGUETTI, 2004). A VMG é extremamente importante, e geralmente está relacionada ao vigor da semente. A baixa VMG contribui para que a semente permaneça por mais tempo no solo, aumentando as chances dessas serem contaminadas por microrganismos fitopatogênicos presentes no solo (BENDIN, 2006).

**Tabela 4-** Efeito de diferentes substratos na porcentagem de germinação, tempo médio de germinação e velocidade média de germinação para sementes de *Aphelandra nitida* R. Br.

Substratos	Germinação (%)	Tempo Médio de Germinação (dias)	Velocidade Média de Germinação (h <sup>-1</sup> )
Sobre Papel	72 a	42,08 ± 5,96 a	0,024 ± 0,002 a
Entre papel	58 ab	42,83 ± 4,16 a	0,023 ± 0,003 a
Areia	30 bc	33,25 ± 26,45 a	0,019 ± 0,011 a
Vermiculita	8 c	22,80 ± 18,36 a	0,016 ± 0,015 a

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.

O substrato influencia diretamente a germinação, em função de sua estrutura, aeração, capacidade de retenção de água e grau de infestação de patógenos, entre outros, podendo favorecer ou prejudicar a germinação das sementes. Constitui o suporte físico no qual a semente é colocada e tem a função de manter as condições adequadas para a germinação e o desenvolvimento das plântulas (FIGLIOLIA et al., 1993). Portanto, a escolha do tipo de substrato deve ser feita em função das exigências da semente em relação ao seu formato e tamanho (BRASIL, 1992).

Os substratos mais utilizados listados pelas Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009) são: o papel-filtro, papel-toalha, pano, papel-mata borrão, areia, e solo os quais devem estar adequadamente úmidos para que forneçam às sementes a quantidade de água necessária à germinação. Neste estudo, o substrato mais adequado para germinação de sementes de *A. nitida* foi o sobre papel filtro, devido os maiores percentuais observados. Andrade & Pereira (1994) relataram para *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) que os substratos sobre vermiculita e sobre papel apresentaram resultados significativamente superiores ao rolo de papel toalha. No entanto, esses mesmos autores verificaram que para sementes de *Passiflora edulis* Sims, que o substrato sobre papel filtro apresentou valores estatisticamente inferiores quando comparados aos tratamentos vermiculita e rolo de papel.

Por conseguinte ao substrato sobre papel, o entre papel apresentou os maiores percentuais de germinação, com médias de 58%. Alves et al. (2002) encontraram excelentes resultados de germinação de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth no substrato entre papel, seguidos do sobre papel. Na germinação de *Cereus jamacaru* DC. em substrato entre papel, foram observados percentuais relativamente elevados quando comparados aos demais (GUEDES et al., 2009). Todavia, Pacheco et al. (2006) para *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., não obtiveram resultados satisfatório de germinação nesse mesmo substrato, tal como Albuquerque et al. (1998) para *Colubrina glandulosa* Perk., evidenciando a variação do melhor tipo de substrato para cada espécie.

A germinação das sementes no substrato areia é considerada baixa em relação aos substratos sobre e entre papel filtro, apenas 30% das sementes germinaram. Estes resultados corroboram com Alvino & Rayol (2007) que observaram para *Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lam.) Urb. (Bombacaceae) um retardo na germinação das sementes no substrato areia. Lima & Garcia (1996) quando avaliaram diferentes substratos a serem empregados no teste de germinação para sementes de *Acacia mangium* Willd., verificaram que o substrato areia não conferiu bons resultados quanto à porcentagem e velocidade de germinação. Esse fato foi ocasionado provavelmente pela dificuldade de manutenção de umidade do substrato areia, visto que este apresenta desuniformidade de retenção e distribuição de água. Além disso, o substrato areia drena excessivamente a água, ficando a parte superior ressecada (LIMA; GARCIA, 1996).

A reduzida porcentagem de germinação no substrato vermiculita não era esperada, visto que a vermiculita é um substrato utilizado com resultados satisfatórios para a

germinação de sementes (FIGLIOLIA et al., 1993; SILVA et al., 2002), por apresentar características como leveza, fácil manuseio e a boa capacidade de absorção de água.

Diversos autores relatam a maior porcentagem de germinação das sementes em substrato vermiculita, tais como, Guedes et al. (2010) para *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith, Alvino & Rayol (2007) para *Ochroma pyramidale*, Alves et al. (2002) com *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. A vermiculita não favoreceu a germinação devido à alta incidência de fungos neste substrato, o que afetou o processo germinativo mesmo com o tratamento prévio de desinfestação das sementes.

De um modo geral, os substratos testados nesse trabalho influenciaram a germinação das sementes de *A. nitida*. É provável que a capacidade de retenção de água de cada substrato aliado às características que regulam o fluxo de água para as sementes possam ter influenciado os resultados. Desta forma, a escolha do substrato é muito importante para obtenção de melhores resultados em um teste de germinação.

#### 4. CONCLUSÃO

- Os aspectos morfológicos dos frutos e sementes de *A. nitida*, assim como as análises ultraestruturais das sementes, possibilitam uma maior compreensão do gênero *Aphelandra*, podendo auxiliar taxonomicamente este grupo tão pouco estudado.
- Anatomicamente observou-se que a semente é exalbuminosa, armazenando as reservas nos cotilédones, sendo oleaginosa, por armazenar apenas lipídeos nos cotilédones.
- O hipoclorito de sódio e o tempo de imersão influenciam diretamente na desinfestação e consequentemente na germinação das sementes, visto que no tratamento controle as sementes tiveram 100% de mortalidade devido à infestação fúngica. Recomenda-se a concentração de hipoclorito de sódio a 5% por 30 minutos para desinfestação das sementes de *A. nitida*.
- É recomendado a utilização do substrato sobre papel para a germinação de *A. nitida*, por conferir uma série de vantagens em relação aos demais tratamentos testados.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAGESABOOPATHI, C. Seed biology of *Andrographis elongata* t. And. (Acanthaceae) – a valuable endemic medicinal plant of India. **International Journal of Biosciences**, v. 3, n. 1, p. 24-27. 2013.
- ALBUQUERQUE, M. C. de F. E.; RODRIGUES, T. D. J. D.; MINOHARA, L. TEBALDI, N. D.; SILVA, L. M. D. M. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de Sagaraji (*Colubrina glandulosa* perk.-Rhamnaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n.2, p.108-111.1998.
- AL-HAKIMI, A. S.; MAIDEEN, H.; LATIFF, A. Pollen and Seed Morphology of *Rhinacanthus* Nees and *Hypoestes* Sol. ex R. Br. (Acanthaceae) of Yemen. **Sains Malaysiana**, v. 44, n.1, p. 7-15. 2015.
- ALVES, E. U.; PAULA, R. C.; OLIVEIRA, A. P.; BRUNO, R. L. A.; DINIZ, A. A. Germinação de sementes de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. em diferentes substratos e temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 169-178. 2002.
- ALVINO, F. O.; RAYOL, B. P. Efeito de diferentes substratos na germinação de *Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lam.) Urb. (Bombacaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 1, p. 71-75. 2007.
- ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S. Efeito do substrato e da temperatura na germinação e no vigor de sementes de Cedro - *Cedrela odorata* L. (Meliaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 34-40. 1994.
- AOYAMA, E. M.; INDRIUNAS, A.; VITÓRIA, E. L.; MONTEIRO, M. M. Caracterização morfológica de frutos e sementes maduros de *Justicia scheidweileri* V.A.W. Graham (Acanthaceae). **Natureza on line**, v.13, n.3, p. 134-140. 2015.
- AZEVEDO, I. H. F.; ROCHA, J. F.; ESTEVES, V. G.; BRAZ, D. M. Microestruturas dos grãos de pólen e de Sementes de Acanthaceae em um Parque Natural, RJ In: 64º Congresso Nacional de Botânica, Belo Horizonte. 2013.
- BALKWILL, K.; NORRIS, F. G.; SCHOONRAAD, E. Taxonomic studies in Acanthaceae: testa microsculpturing in southern African species of *Peristrophe*.

- South African Journal of Botany**, v.52, p.513-520. 1986.
- BALKWILL, K.; SCHOONRAAD, E. Taxonomic studies in Acanthaceae: testa microsculpturing in southern African species of *Peristrophe*. **Journal of Botany**, v.52, p. 513-520. 1999.
- BALWWILL, K.; CAMPBELL-YUNG, G. Taxonomic studies in the Acanthaceae: testa microsculpturing in southern African species of *Thunbergia*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 131, p. 301-325. 1999.
- BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. M. F. **Frutos e sementes**: Morfologia aplicada a sistemática. Viçosa: Editora UFV. 443p. 1999.
- BARTHLOTT, W. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. **Nordic Journal of Botany**, v.1, p. 345-355. 1981.
- BENDIN C., MENDES L.B., TRECENTE V.C. AND SILVA J.M.S. Efeito alelopático de extrato de *Eucalyptus citriodora* na germinação de sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.). **Revista científica eletrônica de agronomia**, v.5, p. 1-7. 2006
- BEVILACQUA, C. B.; REINIGER, L. R. S. GOLLE. D. P.; ROSA, F. C. Desinfestação superficial, germinação e regeneração *in vitro* a partir de sementes de Calêndula. **Ciência Rural**, v.41, n.5, p.761-766. 2011.
- BHATTACHARYA, S.; PURI, S.; JAMWAL, A.; SHARMA, S. Studies on seed germination and seedling growth in Kalmegh (*Andrographis paniculata* wall. ex nees) under abiotic stress conditions. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 1, n. 3, 197- 204. 2012.
- BHOJWANI, S. S. BHATNAGAR, S. P. **The embriology of angiosperms**. 3 ed. New Delhi: Vikas publishing House, PVT. 1974. 277p.
- BOJŇANSKÝC, V. & FARGAŠOVÁ, A. **Atlas of seeds and fruits of Central and East-European flora**: the Carpathian Mountains Region. Dordrecht, Springer. 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV. 1992. 365p.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS. 2009. 399 p.
- CARVALHO, N. M. de.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5ª ed. Jaboticabal: Funep, 2012. 590 p.
- CAVALCANTE, M. T. **Utilização das sementes da faveleira *Cnidoscolus Phyllacanthus* (Mart.) Pax et K. Hoffm) em produtos alimentícios**. 2011. 130f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande-PB, 2011.
- CORNER, E. J. H. **The seeds of dicotyledons**. 2 vols. Cambridge University Press, Cambridge. 1976.
- CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A.; LEITE, I. T. A.; VENTRELLA, M. C.; MATHIAS, A. A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 941-949, 2006.
- DANIEL, T. F.; MCDADE, L. A. Nelsonioideae (Lamiales: Acanthaceae): Revision of Genera and Catalog of Species. **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany**, v. 32, p.1-45. 2014.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Tradução: Berta Lange de Morretes. São Paulo: Editora Bluncher, 1974.
- EZCURRA C. Systematics of *Ruellia* (Acanthaceae) in southern South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 80, p. 787-845. 1993.
- FANK-DE-CARVALHO, S. M.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 377-390. 2005.
- FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. **Germinação: Do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed, 2004. 223p.
- FERREIRA, A.G.; CASSOL, B.; ROSA, S.G.T.; SILVEIRA, T.S.; STIVAL, A.L. & SILVA, A.A. Germinação de sementes de Asteraceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.15, p. 231-242. 2001.



- FIGLIOLIA, M.B.; OLIVEIRA, E.C.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. Análise de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑARODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B (Coord.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993. p.137-174.
- GRAHAM, V. A. Delimitation and infra-generic classification of *Justicia* (Acanthaceae). **Kew Bulletin**, 43: 551-624. 1988.
- GRAVEN, P.; KOSTER, C. G.; BOON, J. J.; BOUMAN, F. Structure and macromolecular composition of the seed coat of the Musaceae. **Annals of Botany**, v.77, p.105-122. 1996.
- GROTH, D.; LIBERAL, O. H. T. **Catálogo de identificação de sementes**. Campinas. Fundação Cargill. 1988.182 p.
- GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; GONÇALVES, E. P.; BRAGA JÚNIOR, L. M.; VIANA, J. S.; COLARES, P. N. Q. Substratos e temperaturas para testes de germinação e vigor de sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. Viçosa-MG, **Revista Árvore**, v.34, n.1, p.57-64. 2010.
- GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; GONÇALVES, E. P.; BRUNO, R. D. L. A.; BRAGA JÚNIOR, L. M.; MEDEIROS, M. S. Germinação de sementes de *Cereus jamacaru* DC. em diferentes substratos e temperaturas. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 31, n. 2, p. 159-164. 2009.
- HARTMANN, H.T, KESTER D. E.; DAVIS, Jr F.T. **Plant Propagation**: principles and practices. 7 ed. New York, Englewood Clippis/Prentice Hall. 2002.
- HEDRÉN, M.; CHASE, M.W.; OLMSTEAD, R.G. Relationships in the Acanthaceae and related families as suggested by cladistic analysis of rbcL nucleotide sequences. **Plant Systematics and Evolution**, v. 194, p. 93-109. 1995.
- INDRIUNAS A, AOYAMA E. M, KAMEYAMA, C. Microescultura da testa da semente madura de *Herpetacanthus chalarostachyus* Indriunas & Kameyama (Acanthaceae). **Natureza on line**, v.12, p. 48-50. 2014.
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**, New York: Mc Graw Hill, 1940.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Domesticação de espécies da flora nativa do Cerrado. In: PARRON, L. M.; AGUIAR, L. M. S.; DUBOC, E.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.; CAMARGO, A. J.

- A.; AQUINO, F. G. (eds). **Cerrado-desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável**. Planaltina, DF. EMBRAPA Cerrados. 2008. 464p.
- KEIL C. A.; MCDADE, L. A. The Mirandea Clade (Acanthaceae, Justicieae, Tetramerium Lineage): phylogenetic signal from molecular data and micromorphology Makes Sense of taxonomic confusion caused by remarkable diversity of floral form. **Systematic Botany**, v. 39, p. 950-964. 2014.
- KITAJIMA. K. Ecophysiology of tropical tree seedlings. In: MULKEY, S.S.; CHAZDON, R.L.; SMITH, A.P. **Tropical forest plant ecophysiology**. New York: Chapman & Hall, 1996. p. 559-596.
- KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Florestais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1983. 233p.
- LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Organização dos Estados Americanos, 1983. P. 170.
- LIMA, de D.; GARCIA, L.C. Avaliação de métodos para o teste de germinação em sementes de *Acacia mangium* Willd. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 18, n. 2, p. 180-185. 1996.
- LIMA, R. M. **Estratégias de propagação para espécies subarbustivas de Acanthaceae Juss. com potencial ornamental**. (Dissertação em Botânica) Universidade de Brasília, Brasília. 2012. 165p.
- MAMEDES, T. C.; SILVA, S. A. Cultivo in vitro de explantes de *Dipteryx alata*. In: VIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA e V JORNADA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO. 2010, Itapemiri. **Anais do VIII Seminário de Iniciação Científica e V Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação**. Universidade Estadual de Goiás, 2010.
- MCDADE, L. A.; MOODY, M. L. Phylogenetic relationships among Acanthaceae: evidence from noncoding trnL-trnF chloroplast DNA sequences. **American Journal of Botany**, v.86, p. 70-80. 1999.
- NESS VON ESENBECK, C.G.; MARTIUS, K.F. Beitrag zur Flora Brasiliens von Maximilian, Prinzen von Wied-Neuwied, .... Mit Beschreibungen von Dr. Nees

- von Esenbeck, ... u. Dr. von Martius, .... **Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae Curiosorum**, v.11, p.1-88. 1823.
- NIMER, E. **Climatologia do Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 1980.
- NOGUEIRA, N. W.; FREITAS, R. M. O.; SOUZA, C. H. G.; DOMBROSKI, J. F. D.; COSTA, C. T. Protocolo de desinfestação de *Petiveria alliacea* L. **Revista Verde**, v.5, n.1, p. 157- 161. 2010.
- NOLETO, L. G.; PEREIRA, M. F. R.; AMARAL, L. I. V. Alterações estruturais e fisiológicas em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf.-Leguminosae-Caesalpinioideae submetidas ao tratamento com hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p. 45-52. 2010.
- PACHECO, M. V.; MATOS, V. P.; FERREIRA, R. L. C, FELICIANO, A. L. P.; PINTO, K. M. S. Efeito de temperaturas e substratos na germinação de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). **Revista Árvore**, v.30, n.3, p.359-367. 2006.
- PAOLI, A. A. S.; BIANCONI, A. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Pseudima frutescens* (Aubl.) Radlk. (Sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p.146-155. 2008.
- PAOLI, A. A. Semente. In: SOUZA, L. A (org.). **Anatomia do fruto e da Semente**. Ponta Grossa: Editora UEPG, p. 127-163. 2006.
- PEICHOTO, M. C. Estudios morfo-anatómicos em espécies de *Justicia* (Acanthaceae) del nordeste argentino. **Darwiniana**, v.36, p. 13-28. 1998.
- PEREIRA, G. A.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira ‘Grande naine’ em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, volume especial, p. 222-226. 2011.
- PERISSÉ, P.; LOVEY, R. J.; ARIAS, C. V.; SCANDALIARIS, M. & MOLINELLI, M. L. Morfología de semilla y plántula de *Dicliptera squarrosa* Nees (Acanthaceae) como fuente de caracteres para su identificación y su relación con estructuras de supervivência. **Phyton**, v. 80, p. 73-78. 2011.
- PRATHANTURARUG, S.; SCHAFFNER, W.; BIITER, K. B. 1996. *In vitro* propagation

- of the thau meicial plant *Andrographis paniculata* Ness: Impacto f different cttokinins. Proceedings of the third Asia-Pacific conference on agricultural biotechnology: Issues and choices. Bangkok (Thailand), **National Science and Technology Development Agency**, p. 523-526. 1996.
- PROATER. **Planejamento e Programação de ações. Espírito Santo**: Secretaria da agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca. 2011. Disponível em <[http://www.incaper.es.gov.br/proater/municipios/Nordeste/Sao\\_Mateus.pdf](http://www.incaper.es.gov.br/proater/municipios/Nordeste/Sao_Mateus.pdf) >. Acesso em: 03 de Novembro de 2015.
- PROFICE, S. R. Estudos taxonômicos em espécies brasileiras de *Aphelandra* (Acanthaceae). **Eugeniana**, v. 23, p.1-7. 1997/1998.
- PROFICE, S. R.; ANDREATA, R. H. P. Revisão taxonômica de *Aphelandra* R. Br. (Acanthaceae) de corola curto-bilabiada. **Instituto Anchietano de Pesquisas**, São Leopoldo, v. 62, p. 7-70. 2011.
- PURVIS, M. J.; COLLIER, D. C.; WALLS, D. **Laboratory techniques in botany**. London, Butterwoth, 1964. 371p.
- RAVEN P. H., EVERT R. F.; EICHHORN S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2007.
- SCOTLAND, R. W.; VOLLESEN, K. Classification of Acanthaceae. **Kew Bulletin**, v. 55, n. 3, p. 513-589. 2000.
- SERT, M. A.; BONATO, C. A.; SOUZA, L. A. Germinação da semente. In: Souza, L. A (org) **Sementes e Plântulas**: germinação, estrutura e adaptação. Ponta Grossa, PR: TODAPALAVRA, 2009.
- SILVA, L. M. M.; RODRIGUES, T. J. D.; AGUIAR, I. B. Efeito da luz e da temperatura na germinação de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Revista Árvore**, v.26, n.6, p.691-697. 2002.
- SURANINPONG, P.; TE-CHATTO, S. In vitro propagation of a woody ornamental *Eranthemum nervosu* (Vahl) R. Br. **Journal of Agricultural Technology**, v.6, n.3, p. 579-588. 2010.
- TALEI, D.; VALDIANI, A.; ABDULLAH, M. P.; HASSAN, S. A. A rapid and effective method for dormancy breakage and germination of king of bitters (*Andrographis*

*paniculata* nees.) seeds. **Maydica**, v. 57, p. 98-105. 2012.

WASSHAUSEN, D. C.; WOOD, J. R. I. Acanthaceae of Bolivia. **Contributions from the United States National Herbarium**, v. 49, p.1-152. 2004.

WASSHAUSEN, D.C. The genus *Aphelandra* (Acanthaceae). **Smithsonian Contributions to Botany**, v.18, p.1-57. 1975.

WITZTUM, A.; SCHULGASSER, A. The Mechanics of Seed Expulsion in Acanthaceae. **Journal of Theoretical Biology**, v.176, p. 531-542. 1995.

ZANON, A.; RAMOS, A. Armazenamento de sementes de espécies florestais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE TECNOLOGIA DE SEMENTES FLORESTAIS, 1., 1984. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Informativo Abrates, v. 1, p. 285-316. 1986.

## II CAPÍTULO

### **Desenvolvimento pós-seminal de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. (Acanthaceae)**

#### **RESUMO**

O presente estudo tem como objetivo caracterizar o desenvolvimento pós-seminal de *Aphelandra nitida* até o estágio de plântula. As sementes foram coletadas em São Mateus-ES, e esterilizadas superficialmente. A germinação foi caracterizada quanto ao tipo e para descrição da morfologia das plântulas nos diferentes estágios de desenvolvimento, foram realizadas observações das plântulas em fases sequenciais, descrevendo os aspectos externos relativos à forma e cor, desenvolvimento da raiz primária, o surgimento de raízes secundárias e emergência dos cotilédones. A germinação de *A. nitida* iniciou-se no 31º dia após a semeadura, e após 60 dias a plântula estava formada. O desenvolvimento das plântulas de *A. nitida* é classificado como epígeo fanerocotiledonar, devido à exposição dos cotilédones em relação ao tegumento. Algumas plântulas apresentaram em seu desenvolvimento paracotilédones com anisofilia, caracterizados por folhas decussadas, evidenciando esta característica desde os estágios iniciais do desenvolvimento da espécie. As informações do desenvolvimento pós-seminal da espécie, principalmente os caracteres foliares reforçam as características encontradas nas plantas adultas, como por exemplo, a anisofilia, sendo estas características morfológicas de grande importância para auxiliar os estudos taxonômicos e em laboratório para avaliar a qualidade fisiológica das sementes e interpretar testes de germinação.

Palavras-chave: Anisofilia, Germinação, Plântula, Semente

## ABSTRACT

The present study aims to characterize post-seminal development of *Aphelandra nitida* up to the stage of seedling. The seeds were collected in São Mateus-ES, and superficially sterilized. Germination was characterized according to its type. Description of seedling morphology in different developmental stages was carried by observation of sequential stages and description of the external aspects, accounting for form, color, primary root development, formation of secondary roots and cotyledon emergence. Germination of *A. nitida* started in the 31st day after sowing, and after 60th days the seedlings were formed. The development of *A. nitida* seedlings is classified as epigeal and phanerocotyledonar due to cotyledonal exposition in relation to the tegument. Some of the seedlings had, in their development, anisophyllous paracotyledons characterized by decussate leaves, evidencing this feature since early stages of seedling development the species. Information on post-seminal development of *A. nitida*, especially of the leaves, evidences their relation to features in adult plants. These morphological features are fundamental to support taxonomic studies and, in the laboratory, will help evaluate the physiological quality of the seeds and interpret germination tests.

Key-words: Anisophilly, Germination, Seed, Seedlings

## 1. INTRODUÇÃO

*Aphelandra nitida* Ness & Mart. é uma espécie endêmica do Brasil, distribuindo-se restritamente nos estados do Espírito Santo, Bahia, Sergipe e Alagoas, tendo poucos registros para o Espírito Santo (PROFICE et al., 2016). Ocorre em áreas de Mussununga e transição entre a Restinga e Mata Pluvial Atlântica. Apresenta frutos secos do tipo cápsula, com deiscência explosiva, o que muitas vezes dificulta estudos das características das sementes e desenvolvimento da plântula.

Os estudos sobre a cobertura vegetal do estado do Espírito Santo são esparsos, somando-se a isso a especulação imobiliária, que pressiona as áreas mais próximas ao litoral. Como consequência, tem-se a devastação demasiada da vegetação de restinga com a remoção da vegetação para desenvolvimento imobiliário, estabelecimento de espécies exóticas, coleta de espécies vegetais de interesse paisagístico e alteração do substrato original (PIMENTEL & SILVA, 2011).

O manejo, conservação e a reconstituição de florestas tropicais dependem da compreensão da regeneração e outros processos ecológicos que, por sua vez, estão atrelados à realização de estudos que permitam a precisa identificação das espécies vegetais a partir de suas fases juvenis (OLIVEIRA, 1993).

As informações obtidas das fases iniciais do desenvolvimento da plântula podem ser usadas para melhor compreender a estrutura e dinâmica dos ecossistemas naturais, e ainda para auxiliar na definição de estratégia para recuperação de áreas degradadas (SORIANO & TORRES, 1995).

Estudos sobre morfologia de semente e plântulas têm merecido atenção há algum tempo, quer como parte de estudos morfoanatômicos, para ampliar conhecimentos sobre determinada espécie ou agrupamento sistemático vegetal, quer visando ao reconhecimento e à identificação de plântulas de certa região dentro de um enfoque ecológico (OLIVEIRA, 1993).

No Brasil, ainda são poucos os trabalhos sobre a morfologia plântulas de espécies nativas. Alguns dos restritos trabalhos que abordam desenvolvimento pós-seminal para espécies de Acanthaceae é retratado por Perissé et al. (2011) para *Dicliptera squarrosa*, sendo escassos estudos nesta área com as espécies do gênero *Aphelandra* R. Br., bem como para as espécies da família Acanthaceae.



Por habitar um ecossistema extremamente ameaçado, torna-se urgente a ampliação dos estudos das espécies nativas deste bioma, a fim de compreender a ecologia da espécie, fornecendo subsídios para conservação dessas áreas, e, conseqüentemente, maiores informações para a família Acanthaceae. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo caracterizar a morfometria de sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Aphelandra nitida* até a fase de plântula.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos maduros de *Aphelandra nitida* foram coletados no período de junho a dezembro de 2015, na Mata de Restinga (S 18° 45' 22.1'' W 039° 48' 53.6'') no bairro Liberdade, São Mateus-ES. As identificações botânicas foram realizadas por especialistas da Universidade Federal do Espírito Santo. O material fértil foi coletado e depositado no herbário VIES (29855).

Para obtenção das sementes, os frutos ainda imaturos foram envolvidos com sacos de tule (poliamida) com aproximadamente 10,0 x 8,0 cm, e envolvidos com arames. Os sacos contendo os frutos e as sementes foram retiradas após a deiscência dos frutos. As sementes foram armazenadas em envelopes de papel, e acondicionadas em refrigerador a 20°C por 15 dias, até a realização do experimento de germinação.

Para a descrição do desenvolvimento pós-seminal, as sementes passaram por desinfestação superficial utilizando-se a solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 minutos sob agitação, e posteriormente lavadas em água destilada. Após a desinfestação, cinco repetições de 10 sementes cada, foram colocadas para germinar em placas de Petri contendo duas folhas de papel filtro umedecidas com 2,5 vezes o peso do papel (BRASIL, 2009). As amostras foram acondicionadas em câmaras de germinação tipo BOD, 25°C, com fotoperíodo de 12/12 h, sendo umedecidas com água destilada em dias intercalares.

A germinação foi caracterizada quanto ao tipo e para descrição da morfologia das plântulas nos diferentes estágios de desenvolvimento, foram realizadas observações das plântulas em fases sequenciais, descrevendo os aspectos externos relativos à forma e cor, desenvolvimento da raiz primária, o surgimento de raízes secundárias e emergência dos cotilédones. De forma geral, as descrições seguiram os critérios e as terminologias adotados por Duke (1965) e Oliveira (1993). Posteriormente, foram realizadas

ilustrações dos estádios de desenvolvimento das plântulas. As ilustrações foram realizadas manualmente, a olho nu e com auxílio de estereomicroscópio.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação de *A. nitida* iniciou-se no 31º dia após a semeadura (DAS), ocorrendo o rompimento do tegumento na base das sementes, próximo a região da micrópila, com protrusão da raiz primária, apresentando coloração esbranquiçada, com cerca de 0,3 mm de comprimento (Fig. 1A). No 33º DAS, medindo 1,8 cm de comprimento, a raiz primária apresentou pelos absorventes translúcidos e coifa amarelada (Fig. 1B). Segundo Souza et al. (2009), a frequência de pelos pode ser maior nos estágios iniciais do desenvolvimento da raiz, restringindo-se, em fase mais adiantada de desenvolvimento, à região próxima do ápice.

No 34º DAS, observou-se um rápido alongamento da raiz primária (Fig. 1C). No 37º DAS, iniciou-se a diferenciação das raízes secundárias ao longo da raiz axial, a qual apresentava 3 cm de comprimento. Nesta etapa, foi observada uma ruptura longitudinal do tegumento, tendo início uma pequena expansão dos cotilédones (Fig. 1D).

Aos 42 DAS, a raiz primária -de cor amarelada-, assumiu coloração avermelhada, como resultado do acúmulo de antocianina (Fig. 2A), passando a ocorrer distinção de cor com o hipocótilo verde e pequeno, com 0,5 cm de comprimento. Os cotilédones mantiveram-se envolvidos pelo tegumento. Segundo Closer & Bleader (2003), plantas de sombra expostas à luz solar plena tendem a acumular antocianina em seus tecidos. O acúmulo de antocianina nos tecidos vegetais é uma estratégia para proteção contra herbivoria, fungos ou outros patógenos (GORTON & VOGELMANN, 1996; CLOSER & BLEADER, 2003).

Com 44 DAS, as raízes secundárias de coloração esbranquiçada apresentaram maior desenvolvimento. O hipocótilo com coloração verde-claro apresentou um pequeno alongamento (Fig. 1E), e, posteriormente, aos 46 DAS, aumentou-se o número de raízes secundárias e o tegumento apresentou uma ruptura evidente (Fig. 1F).

Aos 50 DAS (Fig. 1G), a plântula apresentou rápido crescimento da raiz primária e um alongamento do hipocótilo, atingindo 2,5 cm de comprimento e coloração verde escuro, levantando o tegumento, o qual se abre totalmente, expondo os cotilédones já expandidos em posição oposta, verdes, sendo possível classificá-los como

paracotilédone, baseando-se na sua forma e coloração. De acordo com Vogel (1980), a adoção do termo “paracotilédone” se dá quando os protofilos são homólogos às primeiras folhas verdadeiras, ligeiramente mais finos, assumindo função fotossintetizante e comuns em plantas fanerocotiledonares.

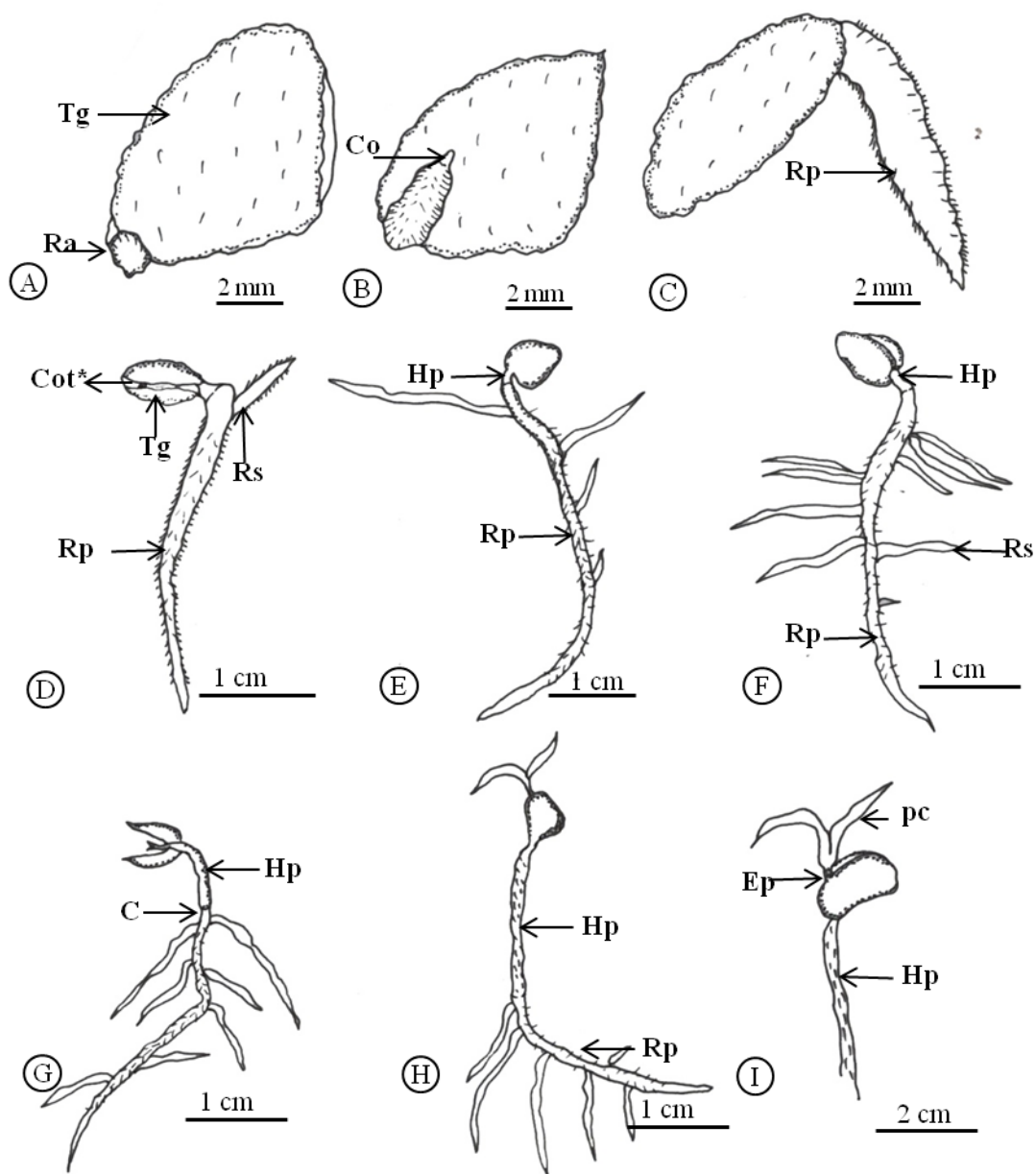
Devido à exposição dos cotilédone em relação ao tegumento e à sua elevação acima do substrato, provocada pelo alongamento do hipocótilo, é possível classificar o desenvolvimento das plântulas de *A. nitida* como epígeo e fanerocotiledonar, segundo Oliveira (1993) e Souza (2009). A germinação epígea fanerocotiledonar é relatada para grande parte das Eudicotiledôneas (DUKE, 1969; SOUZA et al., 2009), como registrado também por Perissé et al. (2013) para *Dicliptera squarrosa*, também pertencente à Acanthaceae.

Aos 60 DAS (Fig. 1H-I e Fig. 2B), as plântulas encontravam-se formadas, com 15 cm de comprimento, classificadas como normal segundo critérios de Brasil (2009). Os paracotilédone encontram-se completamente expandidos, verde escuro, peciolados, margem lisa, ápice agudo e base decorrente, corroborando com os caracteres morfológicos foliares retratados por Zottele (2013) para *Aphelandra nitida*. O hipocótilo é cilíndrico, esverdeado e levemente recoberto por pelos. As raízes são brancas, cônicas, levemente pilosas e espessas próximas ao coleto, afilando-se à medida que se aproximam da coifa.

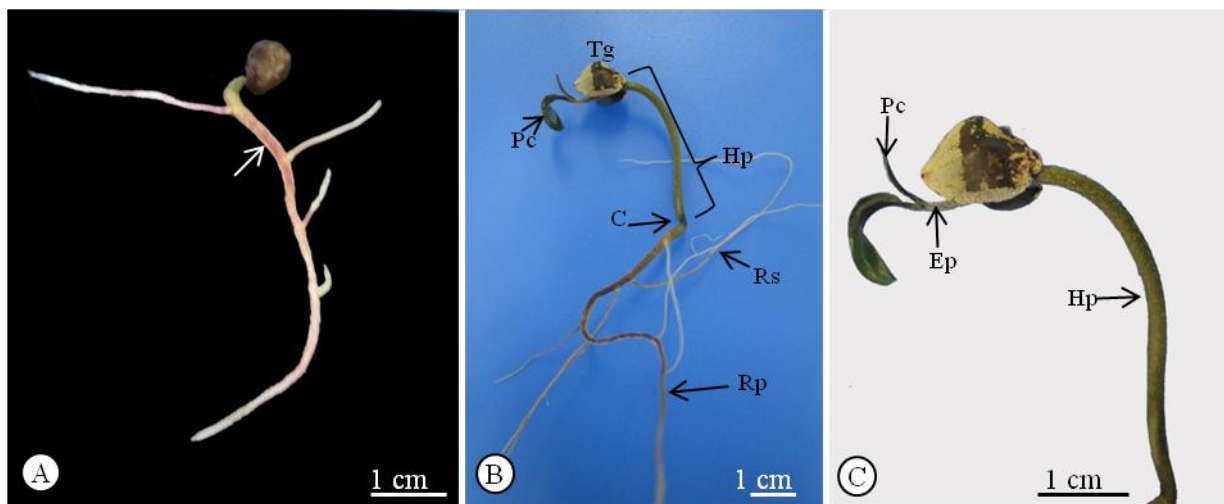
Algumas plântulas apresentaram, em seu desenvolvimento, paracotilédone com anisofilia (Fig. 2B-C). Givnish (1984) apontou que a anisofilia é prevalente em famílias tropicais caracterizadas por disposição das folhas de forma decussada, como, por exemplo, espécies de Acanthaceae, Gesneriaceae, Melastomataceae. Dengler (1999) relatou que a anisofilia é frequente em diferentes gêneros da família Acanthaceae. Porém, segundo Profice & Andreatta (2011), nas espécies de *Aphelandra*, a anisofilia é pouco evidente. No entanto, em duas espécies brasileiras, foi possível observar a presença em diferentes nós, pares de folhas distintas na forma e comprimento, como em *A. nitida* Nees & Mart. e *A. nuda* Nees (PROFICE, 1997/1998), reforçando esta característica para a espécie desde o desenvolvimento inicial da plântula. A anisofilia é uma alteração morfogenética que acomete folhas de um mesmo ramo, causando uma desigualdade foliar, tanto na forma, quanto no tamanho (FONT QUER, 1975; BELL & BRYAN, 2008) E tem uma ampla importância sistemática em angiospermas (TROLL,

1937; DENGLE, 1992). Desde as primeiras descrições botânicas sobre este fenômeno, a anisofilia tem sido considerada como uma adaptação para a captura de luz em ambientes sombreados, minimizando o sombreamento pelas folhas e maximizando a captura de luz (GOEBEL, 1928; GIVNISH, 1984).

Estudos morfológicos de plântulas na fase inicial de desenvolvimento, antes da produção das folhas definitivas, são de grande importância, pois permitem a visualização de estruturas transitórias, primitivas ou derivadas, as quais desaparecem com o desenvolvimento da planta, mas que podem ter relevância para se estabelecer conexões filogenéticas com os grupos em que os órgãos adultos apresentem tais características (RICARDI et al., 1977). As características morfológicas das plântulas de *A. nitida* aos 60 DAS são semelhantes à de plantas adultas, facilitando sua identificação em áreas de ocorrência. Os resultados apresentados podem nortear futuros estudos de propagação de *A. nitida*, visto se tratar de uma espécie vulnerável à extinção.



**Figura 1-** (A-I) Aspectos morfológicos das plântulas de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. Cot\*- Cotilédone no interior do tegumento; C- coifa; Ep- Epicótilo; Hp- Hipocótilo; Ra-Raiz primária; Rp- Alongamento da raiz primária; Rs- Raiz secundária; Tg- Tegumento da semente; pc- Paracotilédone.



**Figura 2-** Plântulas de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. (A) Seta indicando o acúmulo de antocianina na raiz, mostrado pela coloração vermelha; (B) Plântula completamente formada aos 60 dias; (B-C) Plântulas com anisofilia (folhas com tamanho e formas diferenciadas). rp- raiz principal; rs- raiz secundária; hp- hipocótilo; ep- epicótilo; c- colo; t- tegumento; p- paracotilédone.

#### 4. CONCLUSÃO

As informações sobre o desenvolvimento pós-seminal de *A. nitida*, principalmente os caracteres foliares, reforçam as características encontradas nas plantas adultas, como, por exemplo, a anisofilia, sendo estas características morfológicas de grande importância para auxiliar os estudos taxonômicos e, em laboratório, para avaliar a qualidade fisiológica das sementes e interpretar testes de germinação.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELL, A. D.; BRYAN, A. **Plant form**: an illustrated guide to flowering plant morphology. Timber Press. 431p, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília, DF: MAPA/ACS. 399 p, 2009.
- CLOSER, D. C.; BLEADLE, C. L. The Ecophysiology of foliar Anthocyanin. **The Botanical Review**, v.69, n.2, p.149-161. 2003.

- DENGLER, N. G. Anisophylly and dorsiventral shoot symetry. **Journal Plant Science**, v.160, n.6, p.567-580. 1999.
- DUKE, J. A. Keys for the identification of seed-lings of some prominent Wood species in eight Forest types in Puerto Rico. **Annals of the Missouri Botanical Gardens**, v.52, p.314-350. 1965.
- DUKE, J. A. On tropical tree seedlings I. Seeds, seedling of some prominent woody species in eight forest types in Puerto Rico. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.52, n.3, p.314-150. 1969.
- FONT QUER, P. **Diccionario de Botánica**. Editorial Labor, S. A, Barcelona, 1244 p, 1975.
- GIVNISH, T.J. Leaf and canopy adaptations in tropical forests. In: E, MEDINA, HA MOONEY C VA'SQUEZ-YA' NES, eds. **Physiological ecology of plants of the wet Tropics**. Junk, The Hague. 1984.
- GOEBEL, K. **Organographie der Pflanzen insbesondere der Archegoniaten und Samenpflanzen**. Part 1. Allegemeine Organographie. 3d ed. Fisher, Jena. 642 p, 1928.
- GORTON, H. L.; VOGELMANN, T.C. Effects of epidermal cell shape and pigmentation on optical properties of *Antirrhinum petals* at visible and ultraviolet wavelengths. **Plant Physiology**, v.112, p.879-888. 1996.
- OLIVEIRA, E. C. Morfologia de plântulas. In: Aguiar, I.B. De; Piña-Rodrigues, F. C. M. & Figliolia, M. B. (Ed.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES. p.175-214. 1993.
- PERISSÉ P.; PERISSÉ, R. J.; ARIAS, C. V.; SCANDALIARIS, M.; MOLINELLI, M. L. Morfología de semilla y plántula de *Dicliptera squarrosa* Nees (Acanthaceae) como fuente de caracteres para su identificación y su relación con estructuras de supervivência. **Phyton**, v.80, p.73-78. 2011.
- PIMENTEL, T. F. & SILVA, A. G. A população de *Gaylussacia brasiliensis* na vegetação arbustiva aberta na Área de Proteção Ambiental de Setiba, Guarapari, ES. **Natureza on line**, v.9, p.76-81. 2011.

- PROFICE, S. R.; ANDREATA, R. H. P. Revisão taxonômica de *Aphelandra* R. Br. (Acanthaceae) de corola curto-bilabiada. Instituto Anchietano de Pesquisas. **São Leopoldo**, v.62, p. 7-70. 2011.
- PROFICE, S. R. Estudos taxonômicos em espécies brasileiras de *Aphelandra* (Acanthaceae). **Eugeniana**, v.23, p.1-7. 1997/1998.
- PROFICE, S. R.; KAMEYAMA, C.; CÔRTEZ, A. L. A.; BRAZ, D. M.; INDRIUNAS, A.; VILAR, T.; PESSOA, C.; EZCURRA, C.; WASSHAUSEN, D. 2016. Acanthaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000033> (27/03/2016).
- RICARDI, M.; TORRES, F.; HERNÁNDEZ, C.; QUINTERO, R. Morfologia de plântulas de arbores venezolanos. **Revista Florestal Venezuelana**, v.27, p.15-56. 1977.
- SORIANO, S.; TORRES, R. B. Descrição de plântulas de árvores nativas. In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, 9., 1992, Ilha Solteira. Anais... Campinas: SBSP. p.27-46. 1995.
- SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S.; MOURÃO, K. S. M.; ALBIERO, A. L. M.; MONTANHER, D. G. & PAOLI, A. A. S. Morfologia da Plântula e do Tirodendro. In: SOUZA, L. A. (Org.) **Sementes e Plântulas**. Ponta Grossa: TODAPALAVRA. p. 122-190. 2009.
- VOGEL, E. F. **Seedlings of dicotyledons**: structure, development, types, descriptions of 150 woody Malesian taxa. Wageningen: Centre for Publishing and Documentation. 465 p, 1980.
- ZOTTELE, L. **Morfo-anatomia de folhas, brácteas e pétalas de seis espécies de *Aphelandra* R. Br. (Acanthaceae)**. Monografia não publicada, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus. 81 p. 2013.



### CAPÍTULO III

#### **Influência dos diferentes tipos de estacas caulinares no enraizamento e morfoanatomia de *Aphelandra nitida* Ness & Mart.**

##### **RESUMO**

A estaquia caulinar é uma técnica de propagação muito utilizada na produção comercial de diversas espécies na horticultura, floricultura e para espécies florestais visando um interesse ecológico, tendo como vantagens a manutenção de todas as características da planta matriz. Em geral, as espécies de Acanthaceae são propagadas com êxito por esta técnica, no entanto, trabalhos com espécies de *Aphelandra* são escassos. *A. nitida* possui frutos deiscentes que liberam as sementes a longa distância, dificultando a propagação via germinação, viabilizando a estaquia caulinar como o melhor método de formação de mudas. Desta forma, o trabalho objetivou-se estudar o enraizamento e a estrutura anatômica de estacas caulinares herbáceas de *A. nitida* utilizando-se diferentes tipos de estacas. Foram selecionadas estacas apicais, medianas e basais, plantadas em vermiculita, sendo realizadas três avaliações, considerando-se a porcentagem de enraizamento e mortalidade, o comprimento e número de raízes, o número de brotações e folhas, além da análise anatômica caulinar e da região de enraizamento. O enraizamento iniciou-se o 36º dia após o plantio, constatando que os primórdios radiciais surgiram diretamente da região basal das mesmas. Entre os tipos de estacas avaliadas, as estacas basais são as mais indicadas para propagação da espécie, por apresentarem maior porcentagem de enraizamento, e menor porcentagem de mortalidade, não sendo encontradas barreiras anatômicas que dificultam o enraizamento em nenhum dos tipos de estacas. No entanto, mesmo obtendo os melhores resultados de enraizamento para as estacas basais, este é considerado baixo, sendo uma espécie de difícil enraizamento.

**Palavras-chave:** Acanthaceae, Anatomia caulinar, Estaquia, Propagação assexuada

## ABSTRACT

The stem cutting is a technique of propagation widely used in the commercial production of species in horticulture, floriculture and for forest species aiming an ecological interest, having as advantages the maintenance of all the characteristics of the matrix plant. In general, Acanthaceae species are successfully propagated by this technique, however, work with *Aphelandra* species is scarce. *A. nitida* possesses dehiscent fruits that release the seeds at long distance, making it difficult to propagate through germination, enabling stem cutting as the best method of seedling formation. The objective of this work was to study the rooting and anatomical structure of *A. nitida* herbaceous stem cuttings using different types of cuttings. Apical, median and basal cuttings were planted in vermiculite, and three evaluations were performed considering the percentage of rooting and mortality, length and number of roots, number of shoots and leaves, as well as the anatomical analysis of the caulinar and the region of rooting. The rooting began on the 36th day after planting, confirming that the root primordia appeared directly from the basal area of the roots. Among the types of cuttings evaluated, basal cuttings are the most suitable for propagation of the species, because they have a higher percentage of rooting, and a lower percentage of mortality, and no anatomical barriers are found that hamper rooting in any type of cuttings. However, even obtaining the best rooting results for the basal cuttings, this is considered low, being a species of difficult rooting.

Key-words: Acanthaceae, Shoot structure, Cutting, Vegetative propagation

## 1. INTRODUÇÃO

A propagação assexuada é a mais utilizada na produção comercial de diversas espécies na horticultura, floricultura (HARTMANN et al., 2002), e para espécies florestais visando um interesse ecológico (HOPPE et al., 1999). Essa técnica tem como vantagens a manutenção de todas as características da planta matriz, a uniformidade nas mudas e a produção de alta qualidade, além de menor custo (HARTMANN et al., 2002; READ; YANG, 1991).

O sucesso da propagação via estaquia de uma determinada espécie vai depender de diversos fatores que estão relacionados ao enraizamento, entre eles, a posição da estaca no ramo, o grau de lignificação, a quantidade de reservas, a diferenciação dos tecidos e o tipo de substrato, pelas suas características químicas e físicas (ONO; RODRIGUES, 1996; ZUFFELLATO-RIBAS; RODRIGUES, 2001).

Espécies de Acanthaceae em geral são propagadas com êxito por estaquia caular como demonstrado os trabalhos de Balu & Algesaboopathi (1995) com *Andrographis lineata* Nees; Lima (2012) para *Justicia lanstyiakii* Rizz. e *Ruellia nitens* Ness propagadas por miniestaquia; Heintze (2015) com *Thunbergia mysorensis* (Wight), Hussein (2008) para *Thunbergia grandiflora* (Roxb ex Rottl.) Roxb e Baldotto & Baldotto (2014) com *Megaskepasma erythrochlamys* Lindau e *Sanchezia nobilis* Hook aplicando-se diferentes reguladores vegetais.

No trabalho de Das (2006) com *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz e Zottele & Aoyama (2014) com *J. wasshauseniana* Profice, os autores utilizaram diferentes tipos de estacas caulinares, e não observaram diferenças entre elas. Entretanto, Salís et al. (2015) estudando a propagação de *Justicia tinctoria* (Oerst.) D. N. Gibson, Zuffelatto-Ribas et al. (2005) com *Odontonema strictum* Kuntze e Rodrigues et al. (2017) com *Justicia brandegeana* Wassh. & L.B. Sm., utilizaram diferentes substratos para o estaqueamento, e observaram diferenças significativas na propagação. Informações sobre propagação de espécies do gênero *Aphelandra* foram abordados de forma restrita no trabalho de Lorenzi & Souza (2008), sendo escassos detalhes sobre os tipos de estacas e substrato para *A. nitida*.

Uma das dificuldades do enraizamento é a característica anatômica do material vegetal a ser estudado. Dependendo da espécie, os tecidos mecânicos que a constituem

podem atuar como uma barreira para a emissão dos primórdios radiciais, bloqueando sua formação (WRITE; LOVELL, 1984).

Em algumas espécies, barreiras anatômicas específicas como a presença de fibras e esclereides no floema primário do caule, formando um anel contínuo nesta região, podem bloquear mecanicamente os primórdios de raiz e em caules mais velhos a presença de uma bainha de esclerênquima perivascular pode constituir um obstáculo no desenvolvimento das raízes (LOVELL; WHITE, 1986). Por isso, conhecimentos da estrutura interna do caule permite entender a origem das raízes adventícias (FERRI, 1997).

Os autores em geral citam que as raízes adventícias podem originar-se das células epidérmicas, do córtex, do câmbio, do floema secundário, do periciclo e do cilindro vascular (ONO; RODRIGUES, 1996), nas proximidades do tecido vascular diferenciado, próximos ou na base das estacas (ESAU, 1965). Em regiões embrionárias ou de crescimento ocorre próxima aos tecidos vasculares, podendo variar entre as espécies, cultivares, com a idade ou natureza da parte utilizada (APPEZZATO-DA-GLORIA; HAYASHI, 2004).

*Aphelandra nitida* Ness & Mart. é uma espécie arbustiva, com inflorescências vistosas, corolas tubulares alaranjadas que atraem diversos polinizadores (NEES VON ESSENBECK; MARTIUS, 1823), caracterizando uma grande importância ecológica. A espécie possui uma restrita distribuição brasileira (PROFICE et al., 2016), e não obstante a isso, está listada como vulnerável a extinção no Espírito Santo (KOLLMANN et al., 2007).

Considerando essa vulnerabilidade, há necessidade de propagação da espécie. Porém a propagação via germinação de sementes é considerada dificultosa por muitos autores, visto que, os frutos de *Aphelandra* R. Br. são do tipo cápsula loculicida de deiscência explosiva (CORNER, 1976; WITZTUM; SCHULGASSER, 1995), liberando às sementes a longa distância, e o número de sementes é reduzido (BARROSO et al., 1999). Uma alternativa para contornar essa dificuldade está no uso de propagação vegetativa, entre elas, a mais comum é a estaquia caular (HARTMANN et al., 2002).

Na literatura trabalhos exploratórios sobre propagação vegetativa de *A. nitida* são inexistentes, e considerando a germinação das sementes uma forma dificultosa de

propagação, a técnica de estaquia destaca-se como a de maior viabilidade econômica para a formação de mudas. Haja vista a distribuição restrita e vulnerabilidade da espécie faz-se necessário a ampliação de estudos de propagação da mesma. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo estudar o enraizamento e a estrutura anatômica de estacas caulinares de *A. nitida* utilizando-se diferentes tipos de estacas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ramos caulinares herbáceos de *A. nitida* foram coletados em maio de 2015 no bairro Liberdade, São Mateus-ES (S-18° 45'034'' WO-39° 45'455''), onde se encontram nativas (Fig. 1A). As identificações botânicas foram realizadas por especialistas da Universidade Federal do Espírito Santo. O material fértil foi coletado e depositado no herbário VIES (29855).

Dos ramos caulinares coletadas foram selecionadas 390 estacas com aproximadamente 15 cm de comprimento (contendo dois nós) (Fig. 1B), sendo 130 obtidas da porção basal dos ramos, 130 da porção mediana e 130 da porção apical (Fig. 1C), cortadas em bisel para aumentar o contato com o substrato, e as folhas retiradas para evitar a desidratação.

As estacas foram levadas para o Laboratório de Botânica do Centro Universitário Norte do Espírito Santo para realização do plantio no mesmo dia da coleta. O plantio foi realizado em copos plásticos de 500 ml, contendo três estacas em cada copo, uma basal, mediana e uma apical, utilizando-se como substrato vermiculita expandida (Fig. 1D). As estacas medianas foram marcadas com barbante para melhor diferenciação. Os copos foram mantidos por 100 dias em um local sombreado próximo ao laboratório, sendo irrigadas em dias alternados.

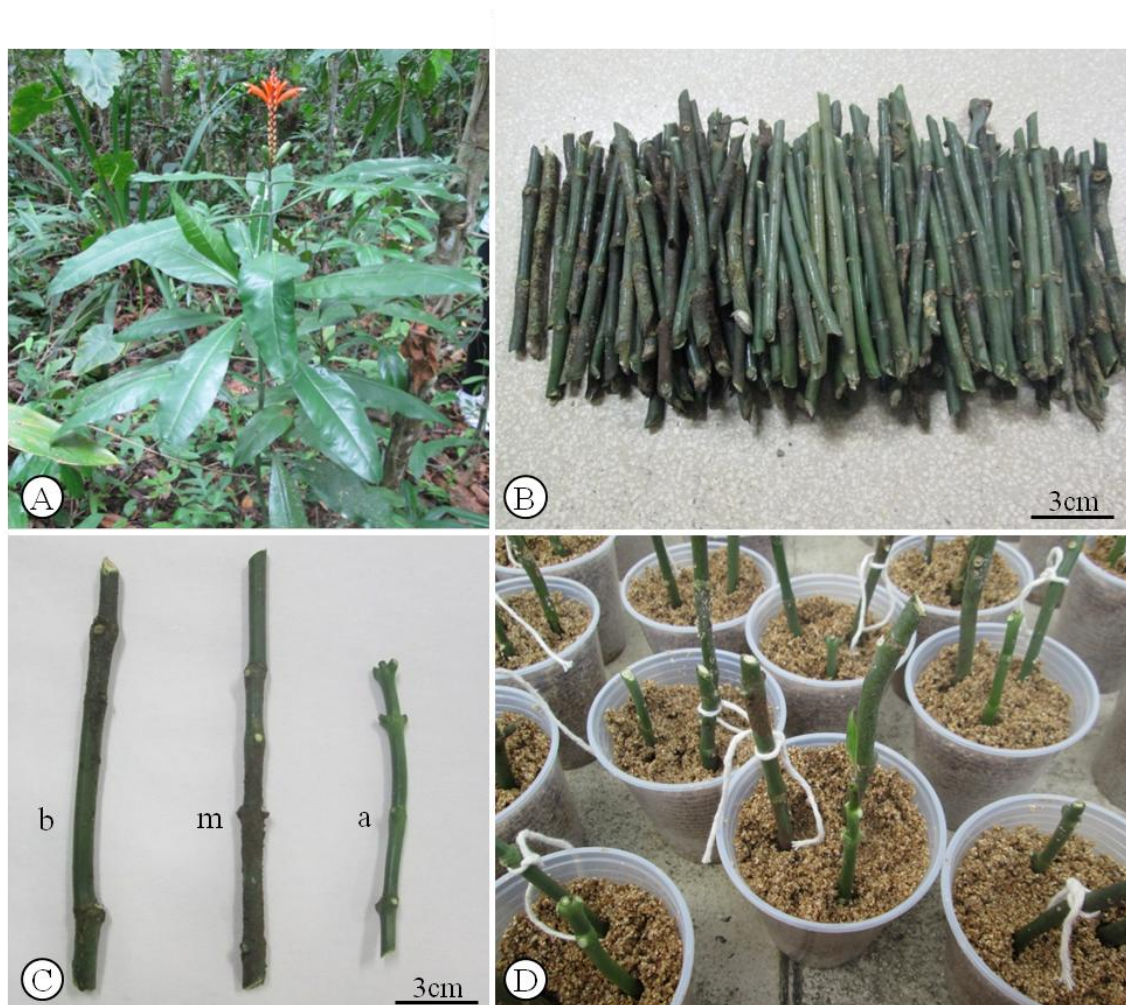
Foram realizadas três avaliações nos períodos de 40, 60 e 80 dias após o plantio, onde observou-se a porcentagem de enraizamento e de mortalidade, número de raízes e brotações e comprimento das raízes e brotações. Para a determinação do comprimento dos brotos e raízes, utilizou-se uma régua graduada em centímetros. A porcentagem de mortalidade foi determinada com base nas estacas que não apresentaram raízes e brotos, assim como necrose em seus tecidos.

Para análises anatômicas foram retiradas 10 amostras de cada tipo de estaca antes do início de enraizamento, e posteriormente 10 amostras das estacas enraizadas. As amostras foram fixados em FAA (formaldeído: ácido acético:álcool etílico 50%, 2:1:18, v/v), de acordo com Johansen (1940), mantidas por 48 horas e posteriormente transferidas para etanol 70%.

Pequenas amostras da porção terminal das estacas foram submetidas à desidratação em série etílica até etanol 95%, posteriormente submetidas a uma série de álcool:xilol, até xilol 100%. O material foi incluído em parafina histológica seguindo as instruções do fabricante e a técnica de Kraus & Arduim (1997). Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo, e as secções transversais e longitudinais obtidas (18  $\mu$ m de espessura) foram coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão acetato 0,1M pH 4,7 (O'BRIEN et al., 1965, modificado).

As lâminas foram analisadas ao microscópio e as ilustrações obtidas em microscópio Leica DM 750, acoplada à câmera fotográfica Leica ICC50, com projeção de escalas micrométricas.

Para a análise dos dados obtidos, utilizou-se a estatística descritiva, calculando-se o desvio padrão entre as médias para obter a variabilidade dos dados amostrais de cada um dos parâmetros analisados. Os dados de enraizamento foram organizados em planilha eletrônica a fim de identificar e corrigir possíveis erros de registro. As porcentagens de enraizamento e mortalidade foram transformadas em arco-seno para normalização dos dados. Os demais parâmetros seguiram para análise de variância (ANOVA) e quando os dados não seguiram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, foram transformados com  $x=\sqrt{x}$ , em seguida passaram pelo teste Tukey, com  $p = 5\%$ , no programa estatístico Assistat 7.7 beta.



**Figura 1-** Montagem do experimento de estaquia caular de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. A- Espécie em seu habitat natural; B- Estacas Caulinares; C- Separação dos tipos de estacas utilizados no experimento: (b) basais, (m) medianas, (a) apicais; D- Estacas caulinares mantidas em copos plásticos contendo substrato vermiculita.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O enraizamento das estacas de *A. nitida* iniciou-se no 36º dia após o plantio (DAP), constatando que os primórdios radiciais surgiram diretamente da região basal das mesmas, não havendo formação de calos, emitindo as raízes independentemente do nó, como observado também para *Justicia wasshauseniana* Profice (ZOTTELE; AOYAMA, 2014) e *Odontonema strictum* Kuntze (ZUFFELATO-RIBAS et al., 2005), ao contrário do observado para *Justicia brandeageana* Wassh. & L.B. Sm, onde houve a formação de calos (RODRIGUES et al., 2017).

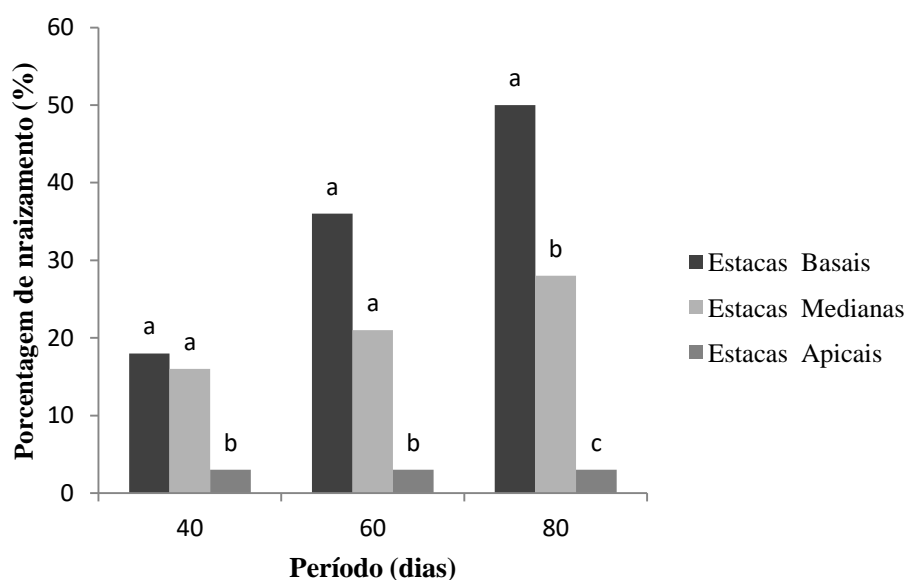
Uma série de mudanças morfológicas pode estar associada com a formação de raízes em estacas, como a formação ou não de calos, o desenvolvimento do primórdio

radicular e a emergência da raiz (THOMAS; SCHIEFELBEIN, 2002). Segundo Hamann (1998) nas espécies consideradas de difícil enraizamento geralmente há formação de calos precedentes à formação de raízes, o que para a espécie em estudo não ocorreu.

Na comparação entre os tipos de estacas, observou-se que houve diferença significativa na porcentagem de enraizamento entre todos os tipos.

No período de 40 DAP, as estacas basais apresentaram a maior porcentagem de enraizamento (18%), mas não diferiram estatisticamente das estacas medianas, que apresentaram (16%), porém distinguiram-se das estacas apicais com 3% de enraizamento. Por conseguinte, no período de 60 DAP as estacas basais obtiveram 36% de enraizamento, no entanto não diferiram das medianas que apresentaram 21%. As estacas apicais permaneceram com os mesmo índices (3%), diferindo-se estatisticamente das demais, como representado na figura 2.

Ao final das avaliações, no período de 80 DAP, observaram-se as maiores diferenças significativas entre as estacas (fig. 2). As estacas basais apresentaram os maiores percentuais de enraizamento (50%), seguidos das medianas (28%) e apicais (3%).

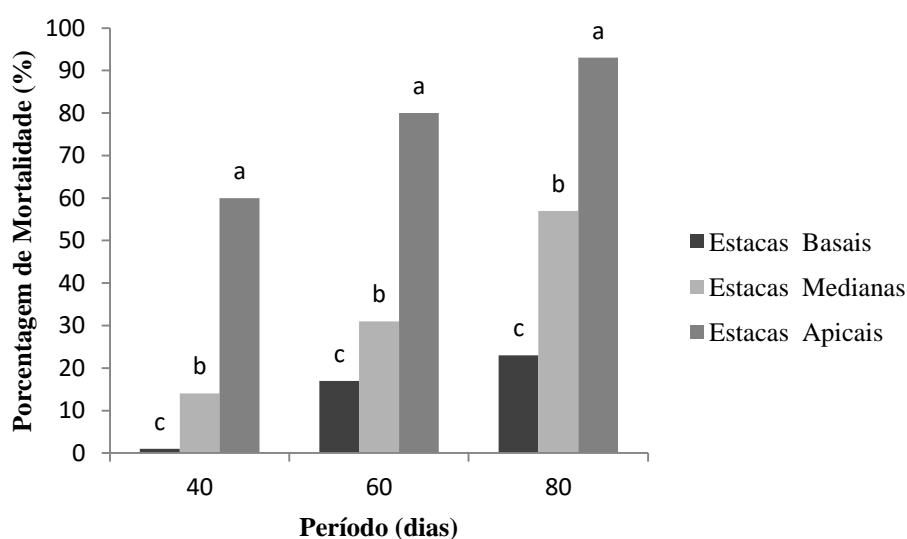


**Figura 2-** Porcentagem de enraizamento das estacas de *Aphelandra nitida* Ness & Mart., após 40, 60 e 80 dias após o plantio. \*Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.



Quanto à porcentagem de mortalidade das estacas, houve diferenças significativas entre os tipos amostrados. Apresentou-se altamente elevada nas estacas apicais em todos os períodos avaliados, chegando a 93% em 80 DAP (Fig.3).

As estacas medianas obtiveram porcentagem de mortalidade consideravelmente alta, cerca de 14, 31 e 57% nos períodos de 40, 60 e 80 dias respectivamente. Todavia, as basais apresentaram as menores taxas, chegando ao valor máximo de 23% em 80 DAP (Fig. 3).



**Figura 3-** Porcentagem de mortalidade das estacas de *Aphelandra nitida* Ness & Mart., após 40, 60 e 80 dias após o plantio.\*Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.

O baixo percentual de enraizamento e alta taxa de mortalidade das estacas apicais, pode estar relacionada à floração e frutificação da espécie. Segundo Hartmann et al. (2002), deve ser evitado o uso de plantas que se encontrem em plena floração ou frutificação para a estaquia caular, pois nesse período há o desvio de metabólitos para a formação de flores e frutos e os assimilados necessários para o enraizamento encontram-se reduzidos (OLIVEIRA et al., 2002). No entanto a espécie *A. nitida* floresce durante todo o ano (PPROFICE, 97/98), não sendo possível a coleta dos ramos sem flores.

Os ramos apicais foram utilizados no experimento de estaquia caular de *A. nitida*, devido a estudos prévios com outras espécies da família, como apresentado por Zottele & Aoyama (2014) com *Justicia wasshauseniana* Profice, onde as autoras

utilizaram estacas apicais mesmo em período de floração e obtiveram sucesso no enraizamento.

Com base no teste estatístico ANOVA, verificou-se que houve diferenças significativas entre os tipos de estacas (basal, mediana e apical), para as variáveis: número de raízes e brotações; comprimento de raízes e brotações. As estacas basais e medianas no período de 40 e 60 DAP não apresentaram diferenças significativas para os parâmetros avaliados (Tabela 1). As principais diferenças foram observadas no período de 80 DAP.

Quanto ao tempo em que as estacas ficaram mantidas no substrato, houve diferenças significativas entre os períodos avaliados. Observa-se que o número de raízes e brotos, assim como o comprimento dos mesmos, tiveram uma progressão conforme o tempo em que ficou mantido no substrato vermiculita, apresentando um menor desenvolvimento no tempo de 40 DAP, como mostra a Figura 2B e a tabela 1. As estacas basais apresentaram as maiores médias para os parâmetros avaliados no período de 80 dias, diferindo estatisticamente dos tempos 40 e 60 DAP. As estacas apicais não apresentaram diferenças significativas para nenhum dos parâmetros nos períodos avaliados, devido à alta mortalidade dessas estacas.

No período de 80 DAP como mostra a tabela 1, pode-se observar que as estacas basais apresentaram uma média de 2,49 raízes por estaca, diferenciando estatisticamente das estacas medianas (1,53) e apicais (0,22). Em relação ao comprimento das raízes, as estacas basais de *A. nitida* (1,22 cm) apresentaram maior comprimento que as estacas medianas (0,63 cm) e apicais (0,07 cm).

As estacas basais apresentaram maior número de brotações (1,60) comparado às estacas medianas (0,99). Ambas apresentaram maior número de brotações que as estacas apicais (0,22) (Tab. 1). Para o comprimento das brotações, as estacas basais com 3,69 cm apresentaram maior comprimento que as medianas (2,35 cm) e apicais (0,24 cm) (Tab.1).



**Figura 4-** Estacas caulinares de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. A- estacas antes do processo de enraizamento; B- estacas enraizadas no período de 40 dias após o plantio (DAP); C- estacas enraizadas no período de 60 (DAP); D- estacas enraizadas no período de 80 (DAP); E- aspecto geral das estacas no substrato vermiculita. (b) estacas basais; (m) estacas medianas; (a) estacas apicais.

Em função dos resultados obtidos, pode-se observar que as estacas basais de *A. nitida* apresentaram maior porcentagem de enraizamento, número de raízes, brotos e comprimento dos mesmos, bem como a menor porcentagem de mortalidade quando comparados às estacas medianas e apicais. Esse fato também foi observado por Castro et al. (2007) em *Nerium oleander* L. onde as basais apresentaram maior capacidade de enraizamento e brotação. Ramalho et al. (2007) verificaram o maior enraizamento em estacas basais de carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) A.P. de Candolle), tal como *Erythrina crista-galli* L. (CARPANEZZI et al., 2001). Entretanto, Tavares et al. (2012) não encontraram diferenças entre as estacas basais e apicais de erva cidreira (*Lippia alba* (Mill) N. E. Brown), assim como Zottele & Aoyama (2014) para *Justicia wasshauseniana* Profice. Todavia, Chagas et al. (2008) obtiveram maior sucesso de

enraizamento e maior número de brotos apenas nas estacas apicais de *Mentha arvensis* L, indicando uma especificidade de tipos de estaca na propagação de cada espécie.

**Tabela1-** Aspectos morfológicos das estacas caulinares de *A. nitida* Ness & Mart., nos períodos de 40, 60 e 80 dias após o plantio.

Parâmetros	Posição da estaca	Período de Cultivo (dias)		
		40	60	80
Nº de raízes	B	0,41 ± 1,21 A c	1,5 ± 2,68 A b	2,49 ± 3,27 A a
	M	0,11 ± 0,87 A b	0,86 ± 1,94 A b	1,53 ± 2,76 B a
	A	0,58 ± 1,59 B a	0,14 ± 0,96 B a	0,22 ± 1,57 C a
Comprimento da raiz (cm)	B	0,13 ± 0,37 A c	0,86 ± 0,97 A b	1,22 ± 1,52 A a
	M	0,18 ± 0,46 A b	0,62 ± 1,94 A ab	0,63 ± 1,22 B a
	A	0,02 ± 0,23 B a	0,07 ± 0,40 B a	0,07 ± 0,48 C a
Nº de brotações	B	0,64 ± 0,84 A b	1,00 ± 1,63 A b	1,60 ± 1,30 A a
	M	0,65 ± 0,51 A b	0,98 ± 1,62 A a	0,99 ± 1,27 B a
	A	0,19 ± 0,85 B a	0,20 ± 0,83 B a	0,22 ± 0,72 C a
Comprimento das brotações (cm)	B	0,59 ± 1,00 A c	2,21 ± 2,59 A b	3,69 ± 3,42 A a
	M	0,48 ± 0,72 A b	2,13 ± 2,93 A a	2,35 ± 3,26 B a
	A	0,20 ± 1,47 B a	0,24 ± 1,01 B a	0,24 ± 1,03 C a

(B) Estacas Basais, (M) Estacas Medianas, (A) Estacas Apicais. Letra minúscula compara na horizontal e maiúscula compara na vertical. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.

De acordo com Fachinello et al. (1995), ao longo do ramo o conteúdo de carboidratos e de substâncias promotoras e inibidoras do enraizamento apresentam bastante variação e normalmente, os maiores teores de carboidratos se encontram na base dos ramos contribuindo para o enraizamento e sobrevivência das estacas. Além disso, estacas apicais apresentam limitada reserva de nutrientes orgânicos e inorgânicos

em seus tecidos, prejudicando o enraizamento, sugerindo que outros fatores endógenos, além dos carboidratos, podem interagir no processo.

Devido à alta porcentagem de mortalidade dos ramos caulinares das porções medianas e apicais, estes tipos de estacas não são indicados para propagação de *A. nitida*. No entanto, mesmo obtendo os melhores resultados de enraizamento para as estacas basais quando comparado às demais, os percentuais de enraizamento da mesma são considerados baixo (50%) comparando-se com outras espécies da família. Zuffelatto-Ribas et al. (2005) obteve 100% de enraizamento para *Odontonema strictum*, assim como Lima (2012) para *Justicia lanstyakii* e *Ruellia nitens*. Zottele & Aoyama (2014) encontraram resultados promissores para *J. wasshauseniana*, cerca de 99% de enraizamento, considerada espécie de fácil enraizamento. Todavia, Rodrigues et al. (2017) obtiveram apenas 50% de enraizamento para *J. brandegeana*, sendo considerada uma espécie de difícil enraizamento.

Esse fato pode estar associado ao período de coleta das estacas, que ocorreu em Maio, período de Outono. A resposta ao enraizamento é influenciada por mudanças estacionais, as quais não modificam somente a atividade cambial, mas atuam também na mudança do estado morfofisiológico da planta mãe, que altera seus níveis hormonais endógenos e nutricionais, favorecendo ou não o enraizamento (NANDA; KOCCHAR, 1985). No trabalho de Lima (2012), a autora comparou o enraizamento das estacas de *J. lanstyakii* e *R. nitens* nos meses de setembro (primavera) e dezembro (verão) e obteve os melhores resultados de enraizamento, número de raízes e brotações no mês de dezembro. No trabalho de Heintze (2015), com *Thunbergia mysorensis* (Wight), relatou os melhores percentuais de enraizamento para estacas propagadas na primavera, assim como Hussein (2008) para *Thunbergia grandiflora* (Roxb ex Rottl.) Roxb.

Existe certa diversidade de comportamento quanto à melhor estação do ano para a coleta do material vegetativo, onde para espécies de fácil enraizamento a literatura cita que as estacas podem ser colhidas em qualquer época do ano, enquanto para outras espécies, o período de maior enraizamento coincide com a estação de repouso ou com a estação de crescimento (PAIVA; GOMES, 1993; WENDLING et al., 2002).

Outros fatores ambientais podem afetar a estaquia, tais como luz, temperatura, umidade, pragas, doenças e deficiências nutricionais do substrato (RIOS et al., 2001). A qualidade do substrato é um fator determinante para o sucesso no enraizamento de estacas em muitas espécies (LIMA et al., 2003), pois o crescimento depende de condições físicas e químicas do substrato utilizado e das substâncias de reserva que a

planta utiliza para a divisão e alongação celular das raízes (PESCADOR et al., 2007). O substrato vermiculita apresenta boa aeração e drenagem, elevada porosidade, com equilíbrio entre macro e microporos e alta capacidade de retenção de água (KÄMPF, 2000; HARTMANN et al., 2002). Segundo Montanari et al. (2004) substratos com maior porosidade facilitam o crescimento radicular.

A análise do estaqueamento em função do tempo é extremamente importante, principalmente para produção de mudas, onde é possível estabelecer um menor tempo para o transplante destas, sem afetar o desenvolvimento, reduzindo principalmente os custos dos experimentos realizados em casa de vegetação (HARTMANN et al., 1997). No trabalho de Zottele & Aoyama (2014) com *J. wasshauseniana*, os autores não observaram diferenças significativas para estacas basais e apicais no períodos de 45 e 60 DAP, indicando que para futuros trabalhos de produção de mudas da espécie, o tempo de 45 dias é suficiente para o enraizamento e estabelecimento das mudas. Já para *A. nitida*, devido às diferenças encontradas nos períodos avaliados, o tempo de 80 dias é o mais adequado para o estabelecimento das mudas.

Com relação à estrutura morfoanatômica das estacas herbáceas de *Aphelandra nitida*, foram encontradas diferenças entre os tipos de estacas utilizadas apenas quanto ao crescimento, sendo observado crescimento primário nas estacas apicais (Fig. 5A-B), e secundário nas estacas medianas e basais, com câmbio e xilema secundário bem evidente (Fig. 5C, E). As secções transversais e longitudinais das estacas apicais evidenciaram que o caule possui epiderme unisseriada, com paredes espessas (Figs. 5A, B e 6A, B). Em posição subepidérmica ocorre colênquima angular, internamente situa-se o parênquima cortical, composto por células isodiamétricas contendo cristais do tipo ráfides (Fig. 5D), com pequenos espaços intercelulares. Em *A. nitida* não foram encontrados agrupamentos de fibras adjacentes ao floema, ao contrário do observado para outras espécies da família, como em *Odontonema strictum* (ZUFFELLATO-RIBAS et al., 2005), *Justicia wassahuaseniana* (ZOTTELE; AOYAMA, 2014) e *J. brandegeana* (RODRIGUES et al., 2017), o que em geral facilita o enraizamento, devido à ausência de barreiras anatômicas (LOVELL; WHITE, 1986). A medula é parenquimática com células isodiamétricas, alguns idioblastos com cristais de ráfides e pequenos espaços intercelulares.

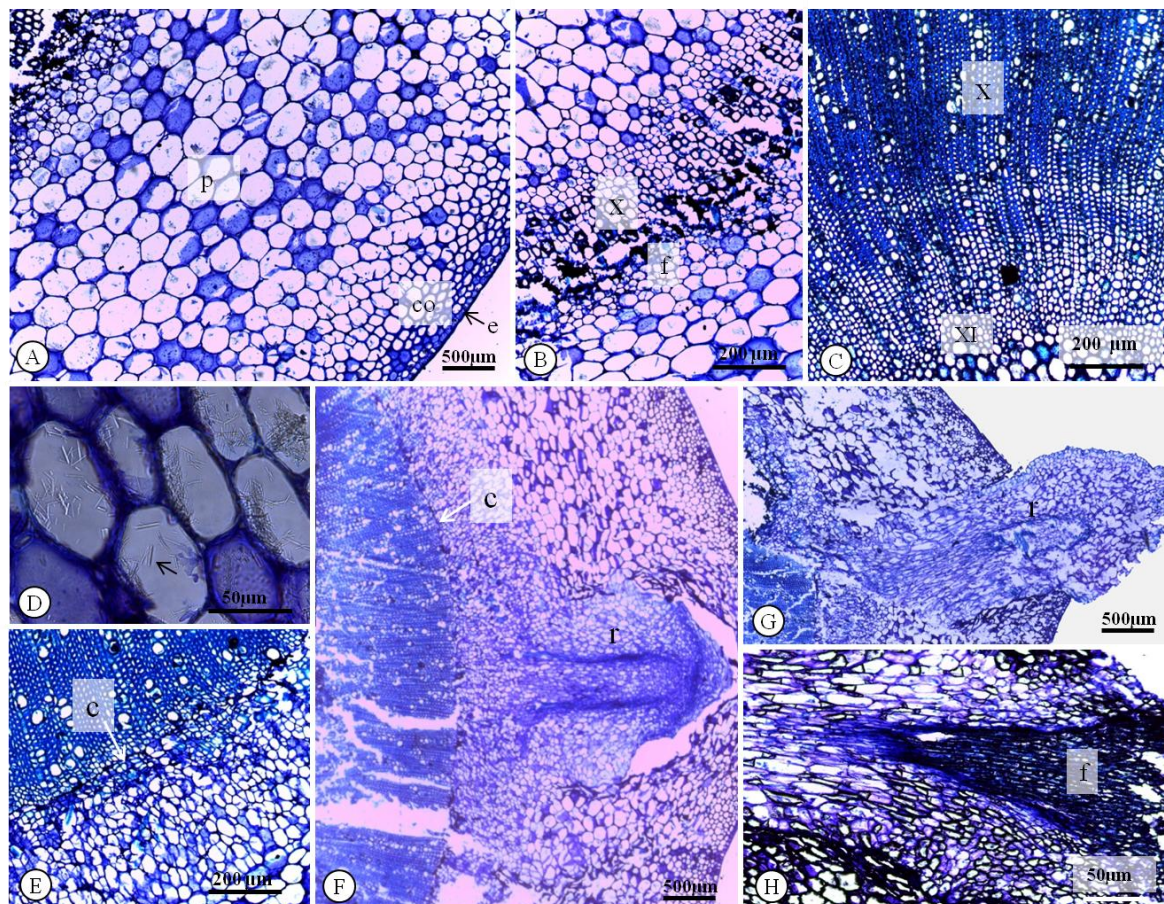
Aos 34 dias após o plantio foi observado na região basal das estacas o início do desenvolvimento radicular, ocorrendo a maior atividade mitótica na região externa do

floema primário, como observado nas secções transversais e longitudinais (Fig. 5E-F, 6 D-E) indicando que a provável origem das raízes laterais é no câmbio próximo ao floema. A formação de raízes adventícias através do desenvolvimento direto a partir dos tecidos caulinares é observada frequentemente em estacas herbáceas, onde essas se formam a partir dos tecidos vasculares, mais precisamente do câmbio (WHITE; LOVELL 1984; ALTAMURA, 1996)

Esse padrão de origem das raízes adventícias é comumente relatado para família. Em *Odontonema strictum* Kuntze os autores verificaram que a maior atividade mitótica ocorre na região externa do floema primário (ZUFFELLATO-RIBAS et al., 2005). Zottele & Aoyama (2014) relatam que para *Justicia wasshauseniana* foi verificada atividade meristemática nas células parenquimáticas do floema próximas ao câmbio vascular, bem como relatado por Rodrigues et al. (2017) para *Justicia brandegeana*.

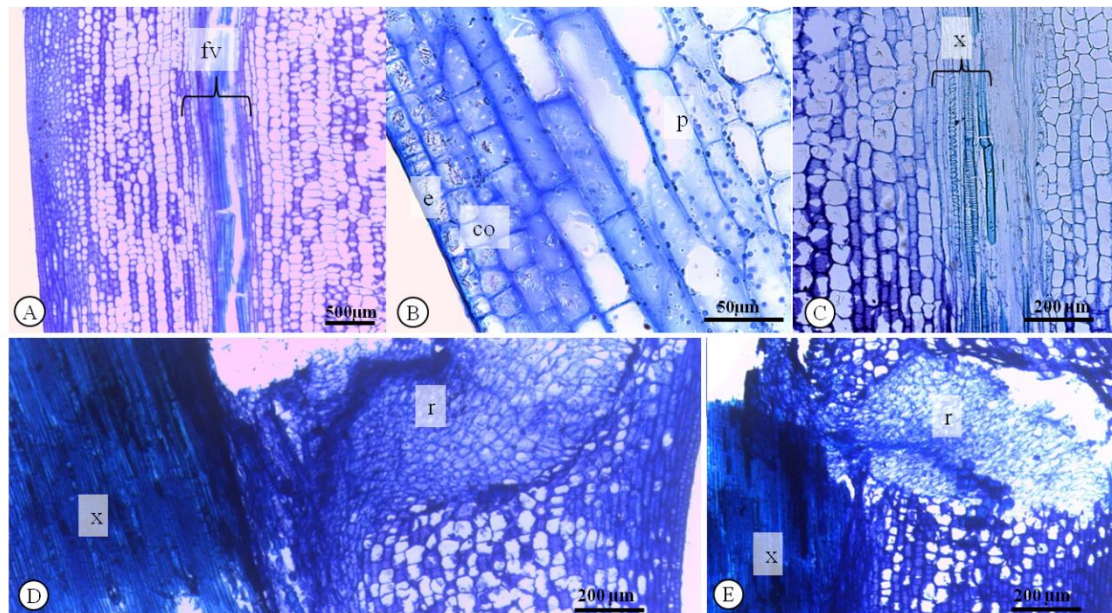
As raízes laterais de origem adventícias encontravam-se totalmente formadas ao final de 38 DAP, rompendo a epiderme (Fig. 5G), ocorrendo, inclusive, a conexão do sistema vascular da raiz lateral com o sistema da estaca (Fig. 5H). De acordo com Moreira et al. (2000) os tecidos vasculares participam da formação das raízes adventícias, conectando a raiz recém formada com o tecido vascular já existente.





**Figura 5.** Secções transversais de estacas caulinares de *Apelandra nitida* Ness & Mart. A-B- Estacas apicais antes do enraizamento; B- Detalhe do feixe vasculares das estacas apicais, C- Detalhe do xilema primário e secundário das estacas basais; D- detalhe dos cristais do tipo ráfides localizados no parênquima; E-H- Estacas medianas; E- região do câmbio vascular; F- início da formação da raiz; H-Região de conexão da raiz adventícia com o caule. e=epiderme; co=colênquima; p=parênquima; c=câmbio; XI= xilema primário; x= xilema secundário r=raiz. Seta indica a presença de cristais de ráfides.





**Figura 6.** Secções longitudinais de estacas caulinares apicais de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. A-C- estacas antes do enraizamento; C- detalhe do feixe vascular; C-D- início da diferenciação radicular. e=epiderme; co=colênquima; p=parênquima; fv= feixe vascular; x= xilema secundário; r=raiz.

O insucesso do enraizamento em alguns casos pode ser causado pela presença de barreiras anatômicas à emergência dos primórdios radiciais (ONO; RODRIGUES 1996), bem como o desenvolvimento de fibras e esclereídes no floema primário, o que não foi relatado para a espécie em estudo, facilitando o enraizamento, assim como a presença de parede celular primária e não lignificada, como ocorre na maioria das plantas herbáceas (WHITE; LOVELL, 1984; HARTMANN et al., 2002).

Os estudos de enraizamento, na sua grande parte, diz respeito às espécies cultivadas e principalmente espécies comerciais de interesse agrônomo, como apresentado nos trabalhos de Silva et al. (2001) e Oliveira et al. (2002) com propagação vegetativa de maracujá, Wendling & Souza Junior (2003) com erva-mate, Bergo (1997) e Carvalho et al. (2008) com café, Contijo et al. (2003) e Lima et al. (2005) com propagação de aceroleiro, dentre outras espécies. A propagação de espécies nativas é de suma importância, pois a utilização dessas espécies ameaçadas na ornamentação de jardins, parques, praças, ruas, residências mantém um banco genético muito maior que aquele de instituições de pesquisa, jardins botânicos e bancos de germoplasma (BARROSO et al., 2007).

Visto que a propagação desta espécie foi realizada por estaquia em substrato permeável, de boa aeração e não houve nenhuma interferência física e barreiras anatômicas que poderia prejudicar o estabelecimento das estacas durante o experimento,

sugerem-se novos estudos com a espécie, coletando as estacas em estações do ano diferente e utilizando-se hormônios vegetais. Em algumas espécies é necessário a aplicação de hormônio vegetal que induza o enraizamento. Segundo Hartmann et al. (1997), aplicações exógenas de reguladores de crescimento aos propágulos vegetativos, principalmente auxinas, proporcionam maior percentual, velocidade e qualidade de enraizamento.

Diversos trabalhos com demais espécies de Acanthaceae obtiveram elevados índices de enraizamento utilizando-se concentrações diferenciadas de hormônio vegetal ácido indolbutírico (AIB), como demonstrado por Solís et al. (2015) com *Justicia tinctoria*, DAS (2006) com *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz, Baldotto & Baldotto (2014) com *Megaskepasma erythrochlamys* Lindau e *Sanchezia nobilis* Hook, e Heintze et al. (2015), com *Thunbergia mysorensis* (Wight), sugerindo-se então a possibilidade de maior enraizamento para *A. nitida* com a utilização de hormônio vegetal.

#### 4. CONCLUSÃO

As estacas basais de *Aphelandra nitida* são as mais indicadas para propagação da espécie, não sendo encontradas barreiras anatômicas que dificultam o enraizamento em nenhum dos tipos de estacas. No entanto, mesmo obtendo os melhores resultados de enraizamento para as estacas basais, este é considerado baixo, sendo uma espécie de difícil enraizamento. Portanto, sugerem-se novos estudos com a espécie, coletando as estacas em estações do ano diferentes e utilizando-se hormônios vegetais para induzir o enraizamento.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTAMURA, M. M. Root histogenesis in herbaceous and woody explants cultured *in vitro*. A critical review. **Agronomie**, Paris, v. 16, p. 589-602. 1996.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; HAYASHI, P. H. Raiz. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: UFV, 2004, p. 267-273.

- BALDOTTO, L. E. B, BALDOTTO, M. A. Adventitious rooting on the Brazilian red-cloak and sanchezia after application of indole-butyric and humic acids. **Horticultura Brasileira**, v.32, p. 434-439. 2014.
- BALU, S.; ALGESABOOPATHI, C. Propagation of *Andrographis lineata* Nees by stem cuttings. **Ancient Science of Life**, v.14, p. 235-239. 1995.
- BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. M. F. **Frutos e sementes: Morfologia aplicada a sistemática**. Viçosa: Editora UFV. 1999, 443p.
- BARROSO, C. M.; DELWING, A. B.; KLEIN, G. N.; BARROS, I. B. I.; FRANKE, L. B. Considerações sobre a propagação e o uso ornamental de plantas raras ou ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, p. 426-429. 2007.
- BERGO, C. L. Propagação vegetativa do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) através do enraizamento de estacas. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras. 1997.
- CARPANEZZI, A. A.; TAVARES, F. R.; SOUSA, V. A. Estaquia de corticeira-do-banhado (*Erythrina crista-galli* L.). **Colombo: Embrapa Florestas**, 2001. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 64).
- CARVALHO, M.; JESUS, A. M. S.; DE CARVALHO, S. P.; GOMES, C. N.; SOARES, M. A. Comportamento em condições de campo de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) Propagados vegetativamente e por sementeira. **Coffee Science**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 108-114. 2008.
- CASTRO, F. V.; SILVA, J. M. M. L. da; EVANGELISTA, T. M.; TELES, H. F.; PIRES, L. L. Efeito de concentrações de hormônio e do tipo de estaca na propagação vegetativa de espiroleira (*Nerium oleander* L.). In: Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais. Goiânia. p. 1-4. 2007.
- CHAGAS, J. H.; PINTO, J. E. B. P.; SUZAN KELLY VILELA BERTOLUCCI, S. K. V.; NALON, F. H. Produção de mudas de hortelã-japonesa em função da idade e de diferentes tipos de estacas. **Ciência Rural**, v.38, n.8. 2008.
- CONTIJO, T. C. A.; RAMOS, J. D.; MENDONÇA, V.; PIO, R.; ARAÚJO NETO, S. E.; CORRÊA, F. L. O. Enraizamento de diferentes tipos de estacas de aceroleira

- utilizando ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 2, p. 290-292. 2003.
- CORNER, E. J. H. **The seeds of dicotyledons**. 2 vols. Cambridge University Press, Cambridge. 1976.
- DAS, N. Propagation prospects of the yielding plant *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz. **Natural Product Radiance**, v. 5, n. 1, p. 42-43. 2006.
- ESAU, K. **Plant Anatomy**. 2 ed. New York: J. Wiley, 1965, p. 69.
- FACHINELLO, J. C.; et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPEL, 1995, 179p.
- FERRI, C. P. Enraizamento de estacas de citrus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.19, p.113-121. 1997.
- HAMANN, A. Adventitious root formation in cuttings of *Loblolly pine* (L.): developmental sequence and effects of maturation. **Trees** 12: 175-180.1998.
- HARTMANN, H. T.; et al. **Plant Propagation: principles and practices**. 7th ed. New York: Englewood Clippings, 2002, 880 p.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D. E.; DAVIES Jr., F.T. **Plant propagation: principles and practices**. 6 ed. New Jersey: Prentice Hall. 1997. 770pp.
- HEINTZE, H, PETRY, H. B, SCHWARZ, S. F, SOUZA, P. V, SCHÄFER, G. Propagação de *Thunbergia mysorensis* (Wight) por estaquia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.8, p.1455-1458. 2015.
- HOPPE, J. M.; SCHUMACHER, M. V.; MIOLA, A. C.; OLIVEIRA, L. S. Influência do diâmetro de estacas no desenvolvimento dos brotos de *Platanus acerifolia*. **Ciência Florestal**, v.9, p. 25-28. 1999.
- HUSSEIN, M.M.M. Studies on the rooting and the consequent plant growth on the stem cuttings of *Thunbergia grandiflora*, (Roxb ex Rottl.) Roxb: 1- Effect of different planting dates. **World Journal Of Agricultural Sciences**, v.4, n.2, p.125-132, 2008.
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**, New York: Mc Graw Hill, 1940.
- KÄMPF, A. N. **Produção Comercial de Plantas Ornamentais**. Guaíba, Agropecuária, pp. 45-73. 2000.

- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual técnico em morfologia vegetal**. Seropédica, RJ: EDUR, 1997.
- KOLLMANN, L. J. C.; FONTANA, A. P.; SIMONELLI, M.; FRAGA, C. N. As Angiospermas ameaçadas de extinção no Estado do Espírito Santo. In: Simonelli M, Fraga CN (org) **Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo**. Vitória, Ipema, pp 108-112. 2007.
- LIMA, N. P.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. Produção de mudas por estaquia de duas espécies de guaco. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p.106-109. 2003.
- LIMA, R. L. S.; SIQUEIRA, D. L.; WEBER, O. B.; BUENO, D. M.; CECON, P. R. Enraizamento de estacas caulinares de acerola em função da composição do substrato. **Semina: Ciências Agrárias**, n. 26, v. 27-32. 2005.
- LIMA, R. M. **Estratégias de propagação para espécies subarbustivas de Acanthaceae Juss. com potencial ornamental**. (Dissertação em Botânica) Universidade de Brasília, Brasília. 2012. 165p.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais do Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 4ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.
- LOVELL, J.; WHITE, P. H. Anatomical changes during adventitious root formation. In: JACKSON, M. B. **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1986, p. 111-140.
- MONTANARI, R. M.; SOUSA, L. A.; LEITE, M. N.; COELHO, A. D.; VICINI, L. F.; STEFANINI, M. B. Plasticidade Fenotípica da Morfologia Externa de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt. & Wilson (Verbenaceae) em Resposta a Níveis de Luminosidade e Adubação. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, p. 96-101. 2004.
- MOREIRA, F. M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ZAIDAN, L. B. P. Anatomical aspects of IBA-treated microcuttings of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 2, p. 221-227. 2000.
- NANDA, K. K.; KOCCHAR, V. R. **Vegetative propagation of plants**. New Delhi: Kalyani, 1985.

- NESS VON ESENBECK, C.G.; MARTIUS, K.F. Beitrag zur Flora Brasiliens von Maximilian, Prinzen von Wied-Neuwied, .... Mit Beschreibungen von Dr. Nees von Esenbeck, ... u. Dr. von Martius, .... **Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae Curiosorum**, v.11, p.1-88. 1823.
- O' BRIEN, T. P.; FEDER, N. & McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **O Protoplasma**, New York, v. 59, n. 2, p. 368-373. 1965.
- OLIVEIRA, J. A de; JUNQUEIRA, N. T. V.; PEIXOTO, J. R.; PEREIRA, A. V. Efeito dos substratos artificiais no enraizamento e no desenvolvimento de estacas de maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 505-508, 2002.
- ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. **Aspectos da Fisiologia do Enraizamento de Estacas Caulinares**. Jaboticabal, FUNEP. 1996.
- PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993.
- PESCADOR, R.; VOLTONI, A. C.; GIRARDI, C. G.; ROSA, F. A. F. Estaquia de Pariparoba-do-Rio Grande do Sul sob efeito do ácido indol-butírico em dois substratos. **Scientia Agraria**, v. 8, p. 391-398. 2007.
- PROFICE, S. R. Estudos taxonômicos em espécies brasileiras de *Aphelandra* (Acanthaceae). **Eugeniana**, v. 23, p.1-7. 1997/1998.
- PROFICE, S. R.; KAMEYAMA, C.; CÔRTEZ, A. L. A.; BRAZ, D. M.; INDRIUNAS, A.; VILAR, T.; PESSOA, C., EZCURRA, C. & WASSHAUSEN, D. 2016. Acanthaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000033> (27/03/2016).
- RAMALHO, R. I. N.; NOLASCO, M. A.; CARVALHO, T.; RIPKA, M.; GIUBLIN, L. M.; NEGRELLO, N.; SCHEFFER, M. C. Enraizamento de estacas de carqueja em função de diferentes substratos e posições do ramo em plantas masculinas e femininas. **Scientia Agraria**, v. 8, p.269-274. 2007.
- READ, P. E. & YANG, G. Plant growth regulator effects on Rooting of forced softwood cuttings. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 300, p. 197-200, 1991.

- RIOS, M. N.; RIBEIRO, J. F.; REZENDE, M. E. Propagação vegetativa: enraizamento das estacas de espécies nativas de Mata de Galeria. In: Ribeiro JF, Silva JCS, Fonseca CEL (org) **Cerrado**: caracterização e recuperação de Matas de Galeria. Planaltina, DF. EMBRAPA Cerrados. pp 455-491. 2001.
- RODRIGUES, J. P.; ZOTTELE, L.; BOROTO, R. C.; AOYAMA, E. M. Enraizamento e anatomia de estacas caulinares e *Justicia brandegeana* Wassh. & L.B. Sm. (Acanthaceae) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, v.4, n.1, p. 45-56. 2017.
- SALÍS, C. A.; JIMÉNEZ, V.; ARIAS, J. Propagación asexual de azul de mata (*Justicia tinctoria* (Oerst.) D. N. Gibson, Fam. Acanthaceae) por medio de estacas. **Agronomía Costarricense**, v. 39, n. 2, p. 91-103. 2015.
- SILVA, R. P.; PEIXOTO, R. R.; JUNQUEIRA, N. T. V. Influência de diversos substratos no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 377-381. 2001.
- TAVARES, I. B.; MOMNTÉ, V. G.; BARRETO, H. G.; CASTRO, H. G.; SANTOS, G. R.; NASCIMENTO, I. R. Tipos de estacas e diferentes substratos na propagação vegetativa da Erva Cidreira (Quimiotipos I, II E III). **Biosciencia Journal**, v.28, p.206-213. 2012.
- THOMAS, P.; SCHIEFELBEIN, J. Cloning and characterization of an actin depolymerizing factor gene from grape (*Vitis vinifera* L.) expressed during rooting in stem cuttings. **Plant Science**, v.162, p.283-288. 2002.
- WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; GROSSI, F. Curso intensivo de viveiros e produção de mudas. **Documentos 79**. Colombo: Embrapa Florestas, 2002. 48 p.
- WENDLING, I. SOUZA JÚNIOR, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestaquia de material juvenil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003, Chapecó. Anais. [Chapecó]: EPAGRI, 2003.
- WHITE, J. & LOVELL, P. H. The anatomy of root initiation in cuttings of *Griselinia littoralis* and *Griselinia lucida*. **Annals of Botany**, London, v. 54, p. 7-20. 1984.

- WITZTUM, A.; SCHULGASSER, A. The Mechanics of Seed Expulsion in Acanthaceae. **Journal of Theoretical Biology**, v.176, p. 531-542. 1995.
- ZOTTELE, L.; AOYAMA, E. M. Morfoanatomia e enraizamento de estacas caulinares de *Justicia wasshauseniana* Profice (Acanthaceae). **Natureza online**, v.12, n. 4, p.179-184. 2014.
- ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; BOEGER, M. R.T.; BONA, C.; PAES, E. G. B.; PIMENTA, A. C.; MASUDA, E.T. Enraizamento e morfo-anatomia de estacas caulinares de *Odontonema strictum* Kuntze (Acanthaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.11, p.57-61. 2005.
- ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; RODRIGUES, J.D. **Estaquia**: uma abordagem dos principais aspectos fisiológicos. Curitiba: UFPR, 2001. 39p.



## IV CAPÍTULO

### **Efeitos do sombreamento sobre os aspectos morfoanatômicos e ecofisiológicos em *Aphelandra nitida* Ness & Mart.**

#### **RESUMO**

A intensidade luminosa afeta fortemente o desenvolvimento da planta, e em excesso pode resultar em efeito danoso a esta. Um método muito utilizado no estudo das necessidades luminosas das diferentes espécies em condições experimentais é o sombreamento artificial, pois fornecem as parcelas experimentais condições uniformes de iluminação. Essas modificações nos níveis de sombreamento podem condicionar às espécies diferentes respostas fisiológicas, morfológicas e anatômicas. *A. nitida* ocorre em áreas de transição da restinga, associada a ambientes sombreados, e carece de estudos detalhados, visto que possui uma distribuição restrita e encontra-se vulnerável a extinção, desta forma, informações acerca das interações morfológicas, anatômicas e fisiológicas de *A. nitida* com as diferentes condições de sombreamento são de extrema importância, a fim de compreender a capacidade de se desenvolverem em ambientes com gradientes heterogêneos de luz. Indivíduos de *A. nitida* foram obtidos através de estaquia caular, sendo transferidos para estruturas de madeiras cobertas com telas de diferentes malhas de sombreamento (85, 75, 60, 35%) e indivíduos expostos a pleno sol, permanecendo por 190 dias. Ao término do experimento foram avaliados os parâmetros biométricos, área folia, massa fresca e seca, fluorescência da clorofila *a*, pigmentos fotossintéticos e anatomia e histoquímica foliar. Os tratamentos testados não oferecem as mesmas condições para o desenvolvimento da espécie, sendo as condições ideais entre 75 e 35% de sombreamento, no qual a espécie obteve o melhor desempenho. Por outro lado, plantas submetidas ao pleno sol desenvolveram estratégias para contornar o estresse, observando alterações no aparato fotossintético, ressaltando a redução na eficiência fotoquímica, sendo compensada por uma maior dissipação de calor, e investindo em adaptações estruturais, como a redução da área foliar, aumento na espessura do parênquima paliádico, aumento na densidade estomática e compostos lipídicos no mesófilo, indicando a plasticidade adaptativa da espécie.

**Palavras-chave:** Histoquímica, Fluorescência da clorofila *a*, Luminosidade, Plasticidade fenotípica

## ABSTRACT

The light intensity strongly affects the development of the plant, and in excess can result in damaging effect to this. A method widely used in the study of the luminous needs of the different species under experimental conditions is the artificial shading, since they provide the experimental plots uniform conditions of illumination. These changes in levels of shading can condition different species physiological, morphological and anatomical responses. *A. nitida* occurs in Forest of Restinga, associated to shady environments, and lacks detailed studies, since it has a restricted distribution and is vulnerable to extinction. Thus, the objective of this work is to obtain information about the morphological, anatomical and physiological interactions of *A. nitida* in different shading conditions, in order to understand the ability to develop in environments with heterogeneous light gradients. Individuals of *A. nitida* were obtained through stem cutting, being transferred to wood structures covered with screens of different shading meshes (85, 75, 60, 35%) and individuals exposed to full sun, remaining for 190 days. At the end of the experiment, biometric parameters, leaf area, fresh and dry mass, chlorophyll *a* fluorescence, photosynthetic pigments and leaf anatomy and histochemistry were evaluated. The treatments tested did not offer the same conditions for the development of the species, with the ideal conditions being between 75 and 35% shading, in which the species obtained the best performance. On the other hand, plants submitted to full sun developed strategies to overcome stress, observing changes in the photosynthetic apparatus, emphasizing the reduction in photochemical efficiency, being compensated by a greater heat dissipation, and investing in structural adaptations, such as reduction of leaf area, Increase in the thickness of the palisade parenchyma, increase in stomatal density and lipid compounds in the mesophyll, indicating the adaptive plasticity of the species.

Key-Words: Histochemistry, Chlorophyll *a* fluorescence, Luminosity, Phenotypic Plasticity

## 1. INTRODUÇÃO

A luz é primordial para o crescimento das plantas, não só por fornecer energia para fotossíntese, mas também por fornecer sinais que regulam todo seu desenvolvimento (BALLARE, 2014). Variações na qualidade, quantidade, presença ou ausência de luz influenciam fortemente o tipo de desenvolvimento que a planta irá apresentar (SANTOS et al., 2014).

Essa intensidade afeta fortemente a fotossíntese. Se a luz estiver em excesso pode atuar como fator estressante, resultando em efeito danoso à planta (ORT, 2001; PORCAR-CASTELL et al., 2014). Desta forma, um método muito utilizado no estudo das necessidades luminosas das diferentes espécies em condições experimentais é o sombreamento artificial, pois isola e quantifica o efeito da intensidade luminosa e fornecem às parcelas experimentais condições uniformes de iluminação, quando comparadas ao estudo em condições naturais (ENGEL, 1989).

Para minimizar o efeito da luminosidade ou maximizar a captura em resposta às condições ambientais desfavoráveis, as plantas desenvolvem uma série de mecanismos que extraem informações do ambiente luminoso. Essas informações são usadas para coordenar mudanças no crescimento e desenvolvimento vegetal ou como um sinal que leva à expressão da plasticidade fenotípica, entendida como a capacidade de um dado genótipo produzir diferentes fenótipos sob diferentes condições ambientais (VALLADARES et al., 2005; VALLADARES et al., 2007). As plantas apresentam mecanismos fisiológicos eficientes que permitem tolerar a curto ou longo prazo os fatores de estresse do ambiente como excesso de luz, temperaturas extremas e escassez de água (OELZE et al., 2012).

Em resposta à essas condições, a folha é considerada um dos órgãos mais plásticos, alterando sua morfologia e estrutura (CASTRO et al., 2009). A tendência em modificar a estrutura foliar em resposta a diferentes níveis de luz é uma característica compartilhada entre as espécies com alto potencial de aclimação (LARCHER, 2000). Desta forma, modificações nos níveis de sombreamento, aos quais uma espécie está adaptada, podem condicionar diferentes respostas fisiológicas em suas características, morfológicas, fisiológicas e anatômicas.

Dentre os vários aspectos da morfologia foliar, o ângulo foliar é um dos determinantes no processo de captura de luz (GÁLVEZ & PEARCY, 2003). A variação do ângulo foliar entre indivíduos da mesma espécie influencia diretamente na estrutura

interna da folha (FALSTER & WESTOBY, 2003). Assim, é esperado que folhas menores, mais espessas e com menores ângulos foliares, em relação ao eixo da planta, ocorram em ambientes com maior intensidade luminosa, enquanto folhas maiores, menos espessas e com maiores ângulos ocorram em locais de menor intensidade luminosa (LARCHER & BOERGER, 2009).

O aparato fotossintético é altamente sensível às alterações na quantidade e qualidade de luz. O aumento da intensidade luminosa acima da capacidade de utilização pela fotossíntese pode resultar em fotoinibição (TAIZ & ZEIGER, 2010; ADAMS et al., 2013). Nesse caso, verifica-se diminuição do rendimento quântico máximo da fotossíntese ( $F_v/F_m$ ) resultante de alterações nas atividades do fotossistema II (FSII), sendo detectadas modificações na emissão de fluorescência da clorofila *a* (OUKARROUM et al., 2012). Desta forma, o funcionamento do FSII é um indicador muito eficiente de estresse em plantas (BALL et al., 1994).

A alta capacidade fotossintética em plantas de sol está relacionada com a maior espessura da folha, proveniente do maior número de cloroplastos nas células do mesofilo (TERASHIMA et al., 2011). As propriedades do mesofilo, principalmente do parênquima paliçádico, garantem a otimização da captura de luz. A alteração da intensidade luminosa pode proporcionar modificações na espessura da folha, seja pelo alongamento ou adição de células do parênquima paliçádico, na densidade estomática, de tricomas, das células epidérmicas, entre outros (CASTRO et al., 2009). Além disso, o estresse provocado na planta pela luz é frequente sob condições tropicais, e a concentração de clorofilas e carotenoides são indicadores da suscetibilidade da planta ao ambiente (VIEIRA, 1996).

O ambiente de luz em que a planta cresce é de fundamental importância, pois a adaptação das plantas a este ambiente depende do ajuste de seu sistema fotossintético, de modo que a luminosidade ambiental seja utilizada de maneira mais eficiente possível. As respostas destas adaptações serão refletidas no crescimento global e distribuição local da planta (ENGEL & POGGIANI, 1991). Além disso, o conhecimento das adaptações anatômicas e fisiológicas de espécies nativas contribui para a escolha adequada das espécies a serem utilizadas em projetos de restauração.

A espécie em estudo, *Aphelandra nitida* Ness & Mart., ocorre em áreas de Mussununga e transição entre a Restinga e Mata Pluvial Atlântica, associada a ambientes sombreados, distribuindo-se restritamente no território brasileiro (PROFICE et al., 2016), e listada com vulnerável a extinção no Espírito Santo (KOLLMANN et al.,

2007). O ecossistema de ocorrência da espécie em estudo é composto por um mosaico de formações vegetais florística e estruturalmente diferenciadas (MENEZES & ARAUJO, 2005). As diferentes intensidades de luz nas diversas fisionomias da Restinga podem provocar mudanças anatômicas e fisiológicas nas espécies, como relatado por Monteiro (2011) e Pereira et al. (2009). Além desse gradiente de diferentes intensidades de luz na Restinga, a abertura de clareiras adiciona outro fator de estresse, como o aumento da radiação solar direta. Atrelado a este fato, a remoção da vegetação para desenvolvimento imobiliário, estabelecimento de espécies exóticas e alteração do substrato original vem devastando de maneira demasiada a vegetação desse ecossistema (PIMENTEL & SILVA, 2011)

Por esse conjunto de fatores ambientais adversos em contraste com sua alta diversidade, é de suma importância estudos contemplando espécies desse ecossistema. Desta forma, este trabalho objetivou-se analisar as interações morfológicas, anatômicas e fisiológicas de *A. nitida* com as diferentes condições de sombreamento, buscando compreender a capacidade de se desenvolverem em ambientes com gradientes heterogêneos de luz.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal**

Indivíduos de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. foram obtidos através de estaquia caular (abordado no capítulo 3) após 100 dias de estaqueamento, contendo aproximadamente um par de folhas expandidas e brotações. Os indivíduos foram transplantados em Agosto de 2015 para copos de isopor com capacidade de 500 mL contendo solo composto pela homogeneização da areia abaixo da serrapilheira (Fig. 1A, B) proveniente da Restinga do Bairro Liberdade, São Mateus-ES, local de coleta das estacas caulares. As plantas permaneceram por 15 dias em um local sombreado externo ao laboratório de Botânica do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) para aclimação. Nesse período, as folhas dos indivíduos foram marcadas com linha branca para identificação das folhas novas (Fig. 1C).

### **2.2 Experimento**

O experimento foi conduzido no Centro Universitário Norte do Espírito Santo, iniciando-se em agosto de 2015. Foram utilizadas estruturas de madeiras cobertas com

telas de diferentes malhas de sombreamento por todos os lados, abrindo-se em um dos lados (Fig. 1D). Três estruturas medindo 65 cm de largura, 90 cm de comprimento, 80 cm de altura, distando 50 cm do solo, porém uma sem cobertura (Fig. 1F). A outra estrutura com 80 cm de largura, 125 cm de comprimento, 130 cm de altura, distando 50 cm do solo (Fig. 1F). As plantas foram submetidas a cinco tratamentos com diferentes condições de sombreamento (Fig. 1G-F): trinta indivíduos expostos a 85% de sombreamento (estes que permaneceram em uma área sombreada próxima ao laboratório de Botânica do CEUNES), trinta indivíduos expostos à 75%, trinta expostos a 60%, trinta expostos a 35% e trinta expostos a pleno sol, totalizando 150 indivíduos. A intensidade luminosa de cada condição foi estimada com um Luxímetro (Li-250A-Light Meter Li-cor-Biosciences) às 12:00h em dias ensolarados dos meses de Agosto e Dezembro de 2015, posicionado em dez diferentes pontos de cada estrutura, sendo realizado uma média entre os valores obtidos (Tab. 1). As plantas foram irrigadas em dias alternados. O experimento finalizou-se em março de 2016, totalizando 190 dias.

**Tabela 1.** Média dos valores de intensidade luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) no experimento com indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart., em diferentes níveis de sombreamento.

Tratamentos (sombreamento)	Intensidade luminosa ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
85%	351,45
75%	605,00
60%	990,12
35%	1584,53
Pleno Sol	2430,95

### 2.3 Biometria foliar

Quinze indivíduos de cada tratamento foram utilizados para obtenção de dados morfológicos. As folhas analisadas seguiram foram as entre os 3º e 4º nós no sentido ápice-base, para cada condição de luminosidade. Foram contabilizados número de folhas, mensurados o comprimento e largura do limbo, comprimento do pecíolo e ângulo foliar, com o auxílio de transferidor (LARCHER & BOEGER, 2009).

## 2.4 Área Foliar

Para estimativa da área foliar, foram escolhidos aleatoriamente 10 indivíduos de cada tratamento. As folhas dos indivíduos foram contornadas com lápis sobre papel tipo sulfite, recortadas e colocadas em estufa com temperatura de 60°C. Para obtenção da estimativa da área foliar foi utilizado regra de três simples, relacionando a massa dos contornos de papel sulfite com a massa de um quadrado de papel sulfite de 25 cm<sup>2</sup> (JORDÃO et al., 1988).



**Figura 1.** Montagem do experimento com *Aphelandra nitida* Ness & Mart. submetidas a diferentes condições de sombreamento. (A) coleta do solo proveniente da Restinga do bairro Liberdade, São Mateus-ES; (B) transplante das estacas enraizadas para copos contendo solo; (C) Detalhe das folhas marcadas com linha para diferenciação das folhas

novas; **(D)** Detalhe da estrutura de madeira coberta com tela; **(E)** Indivíduos expostos a condição de 85% de sombreamento; **(F)** Indivíduos expostos as condições de 75, 60 e 35% de sombreamento e pleno sol como indicado na imagem.

## **2.5 Determinação de massa**

As folhas e raízes dos indivíduos utilizados na avaliação dos dados morfológicos foram pesadas em balança de precisão (Marte AY220) para obtenção de massa fresca e em seguida foram acondicionadas em sacos de papel, etiquetados e levados à estufa com temperatura de 60°C por 48h, até obtenção de massa seca constante e pesados novamente.

## **2.6 Fluorescência da Clorofila *a***

A leitura da fluorescência transiente da clorofila *a* foi realizada em folhas totalmente expandidas, utilizando-se um fluorômetro portátil (Handy-PEA, Hansatech, King's Lynn, Northfolk, England), como descrito por Strasser & Strasser (1995). A avaliação foi realizada pela manhã (entre 08:00-9:00h) ao final do experimento em folhas previamente adaptadas ao escuro com uso de cliques foliares durante 30 minutos, período suficiente para a oxidação completa do sistema fotossintético (OUKARROUM et al., 2007; CHEN et al., 2015).

A emissão da fluorescência da clorofila *a* foi induzida por um único e forte pulso de luz [3000 $\mu$ mol (fótons) m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>] e registrada entre 10 $\mu$ s e 1 s em uma área de 4mm de diâmetro. A fluorescência aos 50 $\mu$ s foi considerada como F<sub>0</sub> (fluorescência inicial) e aos 300ms considerada como F<sub>M</sub> (fluorescência máxima).

Para análise do comportamento do fotossistema II, os parâmetros avaliados foram: fluorescência inicial ou basal [F<sub>0</sub>]; o rendimento quântico fotoquímico máximo para fotoquímica primária, ou eficiência fotoquímica máxima do FSII, [F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>]; os máximos fluxos específicos por centro de reação (RC) em termos de absorção [ABS/RC], dissipação [DI<sub>0</sub>/RC] e por fim o índice de desempenho para conservação de energia para redução dos aceptores finais do FSI [PI<sub>ABS</sub>].

## **2.7 Determinação de pigmentos fotossintéticos**

Para determinação do teor de clorofila e carotenoides, foram utilizadas folhas expandidas obtidas de dez indivíduos para cada tratamento escolhidos aleatoriamente. Amostras das folhas foram seccionadas em pequenos fragmentos e pesados formando



dez amostras de cada tratamento, com no mínimo 0,3g de folhas frescas, e posteriormente armazenadas em papel alumínio e congeladas à temperatura de -20°C, por 7 dias. A extração dos pigmentos foi realizada segundo técnica descrita por Lichtenthaler (1987) sob baixa luminosidade para impedir sua degradação pela luz. O material congelado foi macerado com acetona P.A. e em seguida filtrado com papel de filtro. A solução resultante foi transferida para tubos de ensaios envolvidos com papel alumínio, completando a solução com acetona P.A. Os tubos foram inseridos em um recipiente com gelo até a leitura das amostras. Posteriormente foram transferidos para cubetas e as leituras foram realizadas sob penumbra em espectrofotômetro (Spectrophotometer SP 1105) nos comprimentos de onda de 710nm (resíduos), 661,6nm (clorofila *a*), 644,8nm (clorofila *b*) e 470nm (carotenoides). O conteúdo de cada pigmento foi calculado pelas equações apresentadas por Lichtenthaler (1987):

$$Cl_a = [(11,24 A_{661,6}) - (2,04 A_{644,8})] (VM^{-1})$$

$$Cl_b = [(20,13 A_{644,8}) - (4,19 A_{661,6})] (VM^{-1})$$

$$Cl_{a+b} = (7,05 A_{661,6}) + (18,09 A_{644,8})$$

$$Cl_{ab}^{-1} = Cl_a Cl_b^{-1}$$

$$\text{Carotenoides} = [(1000 A_{470}) - (1,90 Cl_a) - (63,14 Cl_b)] 214^{-1}$$

Onde:

**A** é a absorbância, **V** é o volume da amostra (mL), **M** é a massa fresca da amostra (mg),

**Cl<sub>a</sub>** é o valor de clorofila *a* e **Cl<sub>b</sub>** é o valor de clorofila *b*.

Os conteúdos de clorofilas e carotenoides dos tecidos foram expressos em mg do pigmento por grama de massa fresca.

## 2.8 Anatomia e Histoquímica foliar

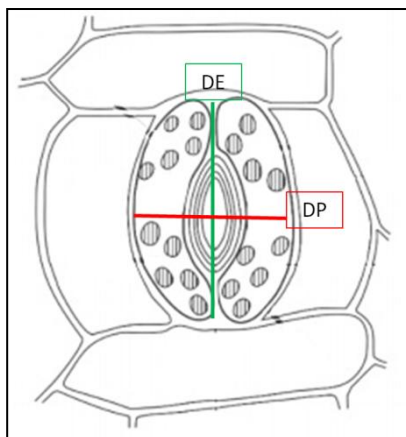
Foram utilizadas folhas completamente expandidas coletadas do 2º nó de dez indivíduos para cada tratamento, sendo os mesmos utilizados para análise de pigmentos fotossintéticos. As folhas foram fixadas em FAA (formaldeído: ácido acético: álcool etílico 50%, 2:1:18, v/v), de acordo com Johansen (1940), mantidas por 48 horas e posteriormente transferidas para etanol 70%. Secções transversais da porção mediana do limbo, da nervura central e do pecíolo foram obtidas, à mão livre, com o auxílio de

lâmina de barbear e isopor. Posteriormente foram clarificadas com solução de hipoclorito de sódio a 25%, coradas com azul de alcian 0,5% e safranina 1% (LUQUE et al., 1996) e montadas em lâminas semipermanentes com verniz vitral incolor (PAIVA et al., 2006).

Para obtenção da espessura do parênquima clorofiliano (paliádico e lacunoso), foram obtidas 20 fotos de cada tratamento em microscópio Leica DM 750, acoplada à câmera fotográfica Leica ICC50 na objetiva de 40x, para tanto foi utilizado o software ANATI QUANTI (AGUIAR et al., 2007).

O estudo da superfície foliar foi realizado através do método de diafanização segundo Arnott (1959). Foram utilizadas dez amostras de cada tratamento, separando-se pequenos fragmentos das folhas de 1cm x 1cm e submetidas à uma série etílica de 50, 30 e 10% para então serem transferidas para água e posteriormente ao hidróxido de sódio 10% onde permaneceram por 72 horas. As amostras foram lavadas diversas vezes com água e colocadas em solução de hipoclorito de sódio a 25% para finalizar o processo de retirada do conteúdo celular, lavadas e condicionadas em água. Posteriormente foram coradas com safranina 1% (JOHANSEN, 1940), montadas entre lâmina e lamínula com gelatina glicerinada.

Para determinação da densidade estomática (mm<sup>2</sup>) e índice estomático (%), em cada tratamento foram obtidas 50 fotos em microscópio Leica DM 750, acoplada à câmera fotográfica Leica ICC50 na objetiva de 40x. Foi utilizado o Software ANATI QUANTI (AGUIAR et al., 2007), segundo a fórmula de Cutter (1986): índice estomático (IE) =  $[NE / (CE + NE)] \times 100$ , em que NE é o número de estômatos e CE o número de células epidérmicas propriamente ditas. Utilizando-se o mesmo Software, foi realizado uma estimativa da funcionalidade dos estômatos segundo Castro et al. (2009), pela relação diâmetro polar (DP) e diâmetro equatorial, como demonstrado na figura 2.



**Figura 2.** Medidas do diâmetro equatorial (DE) e diâmetro polar (DP) de um estômato.

Para os testes histoquímicos, as secções transversais da lâmina foliar, nervura central e pecíolo (obtidos de folhas fixadas em FAA), foram tratadas com: Sudan IV em etanol para lipídeos totais (PEARSE, 1972) e solução de Lugol para amido (JOHANSEN, 1940). Os reagentes foram inseridos sob as secções diretamente na lâmina e montadas entre lamínulas.

As lâminas foram analisadas no microscópio óptico e as ilustrações obtidas em microscópio Leica DM 750, acoplada à câmera fotográfica Leica ICC50, com projeção de escalas micrométricas.

## 2.9 Análises estatísticas

Os parâmetros analisados nos diferentes tratamentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente o teste de Tukey considerando  $p < 0,05$ , utilizando-se o software estatístico ASSISTAT 7.7 beta. Para os dados de fluorescência da clorofila *a* foram realizados gráficos de linha utilizando-se o programa Excel-Microsoft (2007).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Biometria foliar

Nos diferentes tratamentos foi possível observar que o sombreamento alterou os parâmetros biométricos dos indivíduos como demonstra a tabela 2. As plantas expostas a pleno sol apresentaram os menores valores de média, diferindo-se significativamente em todos os parâmetros avaliados, exceto para o número de folhas.

O comprimento do limbo apresentou as maiores médias para os indivíduos submetidos ao tratamento de 35% de sombreamento, diferindo-se estatisticamente dos indivíduos expostos a pleno sol, que obteve os menores valores. Entretanto, os demais tratamentos com maiores níveis de sombreamento não diferiram estatisticamente entre si.

Para o parâmetro largura do limbo, foram encontradas diferenças significativas apenas nos indivíduos submetidos a pleno sol, em que apresentaram as menores médias quando comparadas as demais condições.

Em contrapartida, o comprimento do pecíolo foi maior nas folhas expostas ao maior sombreamento (tratamentos 85, 75, 60 e 35%), sendo encontrado o maior valor (0,86 cm) para o tratamento de 35% de sombreamento (Tab. 2). Já o ângulo do pecíolo em relação ao caule, foi maior nos tratamentos com menor sombreamento, sendo estes o pleno sol e 35% de sombreamento, assumindo desta forma uma posição mais vertical, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos expostos ao maior sombreamento, que apresentaram gradativamente os menores valores, assumindo a posição horizontal (Tab. 2).

A área foliar apresentou diferença significativa entre os indivíduos expostos ao pleno sol dos demais tratamentos (Tab. 2), apresentando os menores valores de área. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si, apresentando uma área foliar cerca de 2 vezes maior que os indivíduos expostos ao pleno sol.

**Tabela 2.** Parâmetros biométricos das folhas de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. cultivadas em diferentes condições de sombreamento.

Tratamentos (sombreamento)	Nº de folhas	Comprimento do limbo (cm)	Largura limbo (cm)	Comprimento pecíolo (cm)	Ângulo pecíolo/caule (°)	Área foliar (cm²)
85%	5,56 ± 2,17 a	9,55 ± 1,91 ab	3,70 ± 0,81 a	0,78 ± 0,15 ab	13,3 ± 6,7 c	101,14 ± 7,81 a
75%	4,3 ± 2,11 a	9,58 ± 4,50 ab	3,24 ± 1,70 a	0,68 ± 0,29 ab	17,6 ± 7,2 b	95,92 ± 15,81 a
60%	4,70 ± 2,29 a	9,42 ± 4,26 ab	3,34 ± 1,54 a	0,71 ± 0,27 ab	20,0 ± 5,7 b	83,48 ± 16,94 a
35%	5,73 ± 1,89 a	11,83 ± 2,81 a	3,86 ± 1,01 a	0,86 ± 0,29 a	31,2 ± 6,1 a	95,22 ± 10,64 a
Pleno Sol	4,86 ± 2,35 a	7,21 ± 2,85 b	2,68 ± 0,98 b	0,69 ± 0,20 b	35,7 ± 7,1 a	43,29 ± 13,31 b

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.

### 3.3 Determinação de massa

Os valores de massa fresca e seca das folhas expostas a 35% de sombreamento e a pleno sol apresentaram diferenças significativas quando comparados aos indivíduos com maior sombreamento, apresentando os menores valores como mostra a tabela 3. O maior valor de massa fresca e seca foliar foi encontrado para o tratamento de 75% de sombreamento, seguido do tratamento de 85% e 60% de sombreamento respectivamente.

**Tabela 3.** Valores de massa fresca e seca de folhas de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. cultivadas em diferentes condições de sombreamento.

Tratamentos (sombreamento)	Massa Fresca (mg)	Massa Seca (mg)
85%	2,82± 0,82 ab	0,74 ± 0,18 a
75%	3,07± 0,84 a	0,75 ± 0,17 a
60%	1,99 ± 0,82 b	0,52 ± 0,22 ab
35%	1,60 ± 0,87 c	0,41 ± 0,22 b
Pleno Sol	1,45 ± 0,57 c	0,33 ± 0,12 b

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Os valores de massa fresca e seca das raízes também se destacaram nos tratamentos com maior sombreamento, obtendo as maiores médias significativas para o tratamento de 85% de sombreamento, seguidos dos tratamentos 75%, 60%, 35% de sombreamento e pleno sol respectivamente (Tab. 4).

**Tabela 4.** Valores de massa fresca e seca de raízes de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. cultivada em diferentes condições de sombreamento.

Tratamentos	Massa Fresca (mg)	Massa Seca (mg)
85%	6,89 ± 2,33 a	1,14 ± 0,30 a
75%	5,16 ± 0,89 ab	0,76 ± 0,15 ab
60%	5,45 ± 2,22 ab	0,88 ± 0,40 ab
35%	3,80 ± 1,86 bc	0,60 ± 0,30 bc
Pleno Sol	2,68 ± 1,52 c	0,41 ± 0,25 c

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.

### 3.4 Fluorescência da Clorofila *a*

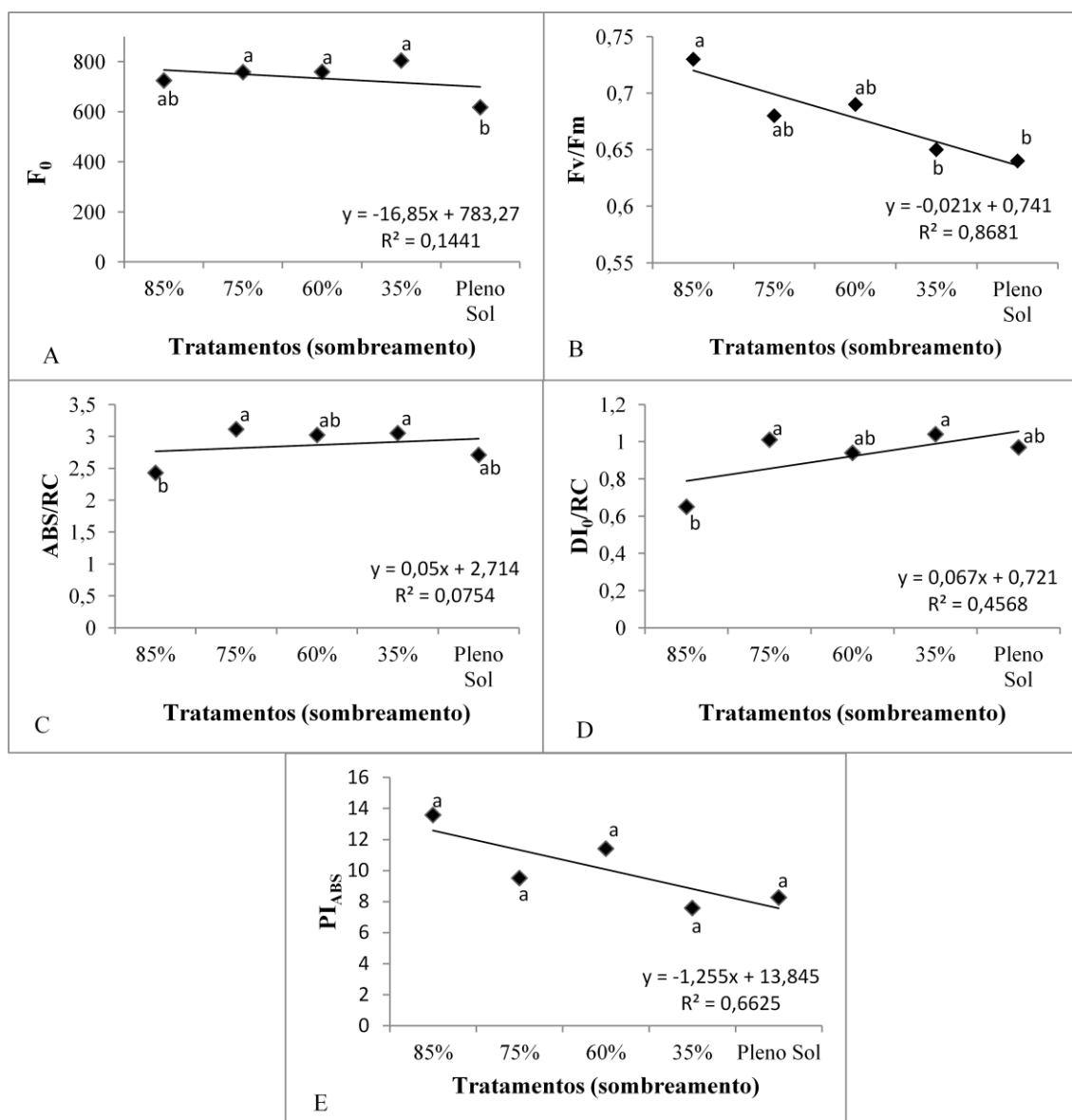
Os valores de fluorescência inicial ( $F_0$ ) apresentados na figura 3A mantém-se relativamente estáveis entre os tratamentos com maior sombreamento, apresentando uma redução significativa no tratamento pleno sol.

A partir da análise de regressão linear, observou-se redução significativa da eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ) com a redução do sombreamento, com menores médias para os tratamentos de 35% de sombreamento e o pleno sol (0,65 e 0,64 respectivamente) (Fig.3B).

Na figura 4A está representado o resultado obtido para o fluxo de energia absorvida por centro de reação (ABS/RC), o qual se manteve relativamente estável nos tratamentos com sombreamento intermediário (75, 60 e 35% de sombreamento), apresentando uma redução das médias para os tratamentos 85% de sombreamento e pleno sol (Fig. 3C).

Os valores do fluxo de energia de dissipação por FSII ( $DI_0$  /RC) permaneceram reduzidos nos indivíduos dos tratamentos com maior sombreamento, apresentando uma progressão nos indivíduos submetidos ao menor sombreamento, representados pelos tratamentos 35% e pleno sol (Fig. 3D).

O índice de desempenho ( $PI_{ABS}$ ) não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (Fig. 3E). Porém, observa-se que as condições com maior sombreamento apresentaram os maiores valores para este parâmetro.



**Figura 3.** Efeitos das diferentes condições de sombreamento sobre a fluorescência Inicial ( $F_0$ ) (A); eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ) (B); fluxo de energia absorvida por CR ( $ABS/RC$ ) (C); Fluxo de energia dissipada por CR ( $DI_0/RC$ ) (D); índice de desempenho  $PI_{ABS}$  (E), em plantas de *A. nitida* Ness & Mart. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.



### 3.5 Determinação de pigmentos fotossintéticos

As concentrações de clorofila *a* não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos em diferentes condições de sombreamento, bem como os valores dos pigmentos carotenoides (Tab. 4). Entretanto, foi observado que os valores de clorofila *a* diminuem com o aumento de luminosidade, mais não diferiram significativamente entre si. Em contrapartida, as concentrações de clorofila *b* apresentaram variações, sendo os indivíduos expostos ao maior sombreamento (85%) os que apresentaram as maiores concentrações, diferindo significativamente entre os tratamentos. Os indivíduos submetidos aos menores níveis de sombreamento (35% e pleno sol) apresentaram os menores valores para este parâmetro.

Assim como observado para o teor de clorofila *b*, os valores de clorofila total representados pela somatória de *Cl a* + *Cl b* (Tab. 5) também se apresentaram maiores nos tratamentos com maior sombreamento, 85% e 75% respectivamente. Em contrapartida, os valores da razão clorofila *a/b* foram menores para estes tratamentos, apresentando as maiores médias para os indivíduos expostos ao pleno sol como observado na tabela 5.

**Tabela 5.** Concentração de pigmentos fotossintéticos em indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento. (Chl *a* = clorofila *a*; Chl *b* = clorofila *b*; Carot = carotenoides; Chl *a* + Chl *b* = soma total dos valores de clorofila *a* + clorofila *b*; Chl *a*/Chl *b* = razão clorofila *a*/clorofila *b*).

Tratamentos (sombreamento)	Chl <i>a</i> (mg gMF)	Chl <i>b</i> (mg gMF)	Carot (mg gMF)	Chl <i>a</i> + Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i>
85%	0,863 ± 0,246 a	0,438 ± 0,260 a	3,860 ± 0,494 a	15,620 ± 4,227	2,461 ± 0,256
75%	0,878 ± 0,344 a	0,374 ± 0,168 ab	3,775 ± 0,819 a	15,169 ± 5,916	2,452 ± 0,318
60%	0,859 ± 0,247 a	0,350 ± 0,124 ab	3,665 ± 3,665 a	14,522 ± 4,318	2,546 ± 0,385
35%	0,645 ± 1,169 a	0,235 ± 0,071 b	3,486 ± 0,447 a	10,578 ± 2,871	2,780 ± 0,235
Pleno Sol	0,625 ± 0,160 a	0,197 ± 0,093 b	3,537 ± 0,453 a	9,865 ± 2,982	3,493 ± 1,086

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.

### 3.6 Anatomia e histoquímica foliar

Em vista frontal, as folhas dos indivíduos submetidos às cinco condições de sombreamento, apresentam células epidérmicas com paredes celulares de formato sinuoso. As folhas são hipoestomáticas, ou seja, apresentam estômatos apenas na face abaxial, sendo estes do tipo diacítico (Fig. 4). O diâmetro polar (DP) e equatorial (DE) dos estômatos apresentaram variações quanto aos tratamentos. A condição de pleno sol resultou em indivíduos com estômatos maiores (Fig. 4E), com DP e DE elevados em relação aos tratamentos com maior sombreamento. Desta forma, a funcionalidade dos estômatos, que é estimada pela relação entre o diâmetro polar e o equatorial, manteve-se elevada no tratamento de pleno sol, e os menores valores foram observados no tratamento com maior sombreamento (85%) (Tab. 6).

**Tabela 6.** Diâmetro polar e equatorial ( $\mu\text{m}$ ), e funcionalidade dos estômatos de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento.

Tratamentos (sombreamento)	Diâmetro Polar ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro Equatorial ( $\mu\text{m}$ )	Funcionalidade
85%	$27,87 \pm 1,55$ b	$22,14 \pm 1,46$ b	$1,18 \pm 0,04$ b
75%	$27,07 \pm 3,77$ b	$21,22 \pm 2,03$ b	$1,27 \pm 0,07$ ab
60%	$27,51 \pm 1,65$ b	$21,39 \pm 1,87$ b	$1,29 \pm 0,08$ a
35%	$28,36 \pm 2,35$ b	$22,38 \pm 1,73$ b	$1,26 \pm 0,06$ ab
Pleno Sol	$35,33 \pm 2,72$ a	$26,14 \pm 1,99$ a	$1,35 \pm 0,09$ a

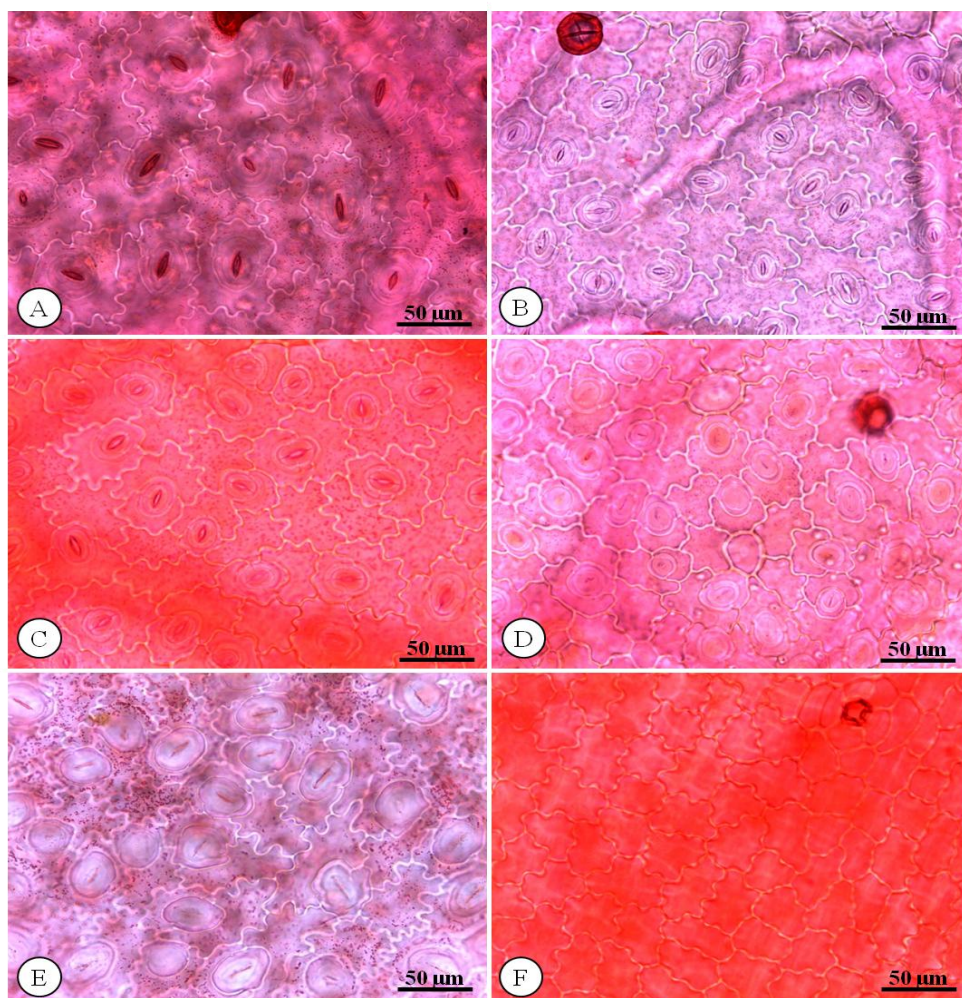
Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade

Assim como observado para o diâmetro dos estômatos, o teste estatístico realizado apontou diferenças na densidade média dos estômatos por  $\text{mm}^2$ , apresentando uma maior quantidade de estômatos por área nos tratamentos com menor sombreamento (35% de sombreamento e pleno sol), média de 238, enquanto os demais tratamentos apresentaram indivíduos com média de 179. Em relação ao índice estomático, em que se considera a frequência dos estômatos em relação às células epidérmicas, não houve diferenças significativas (Tab. 7).

**Tabela 7.** Densidade Estomática (mm<sup>2</sup>) e índice Estomático (%) de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. submetidas a diferentes condições de sombreamento.

Tratamentos (sombreamento)	Densidade Estomática (mm <sup>2</sup> )	Índice Estomático (%)
85%	176,76 ± 19,08 b	29,01 ± 0,72
75%	179,07 ± 17,9 b	28,58 ± 2,95
60%	182,86 ± 25,9 b	30,16 ± 2,08
35%	215,42 ± 13,08 a	34,81 ± 2,75
Pleno Sol	238,24 ± 14,96 a	34,50 ± 3,77

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.



**Figura 4.** Secções paradérmicas foliares de indivíduos de *Aphelandra nitida* Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento. (A-E) Face abaxial; (F) Face ; adaxial; (A) 85% (B) 75% (C) 60% (D) 35% (E) Pleno sol.

Em secções transversais, o limbo dos indivíduos de *Aphelandra nitida* nos cinco tratamentos apresentam epiderme uniestratificada e revestidas por uma fina camada de cutícula em ambas as faces. As células apresentam formato retangular e mesofilo dorsiventral. Em todos os tratamentos foram observados a presença de tricomas tectores unicelulares e tricomas glandulares subsésseis (Fig. 5 A, D, F, H).

Através dos testes histoquímicos, observou-se que a cutícula apresentou reação positiva para lipídeos em todos os tratamentos (Fig. 6), tanto no limbo na nervura central (Fig. 9) quanto no pecíolo (Fig. 13). No tratamento de 35% de sombreamento e pleno sol, os indivíduos apresentaram reação positiva para gotículas de lipídeos distribuídas por todo o mesofilo, principalmente no parênquima lacunoso (Fig. 6E, F, G, H), e reação negativa para os indivíduos expostos aos tratamentos de 60%, 75% e 85% de sombreamento. Em relação aos testes de lugol, a reação foi positiva para os indivíduos de todos os tratamentos, apresentando apenas diferenças na distribuição dos amiloplastos. Nos tratamento de 85%, 75% e 60% de sombreamento (Fig. 7A, B, C), os indivíduos apresentam grãos de amido distribuídos no parênquima paliçádico e lacunoso, entretanto, nos tratamentos de 35% e pleno sol (Fig. 7D, E, F), os indivíduos apresentam amido apenas no parênquima lacunoso, e em menor quantidade quando comparado aos demais tratamentos.

Foram observadas variações quanto à proporção do parênquima paliçádico em relação ao mesofilo. Nos tratamentos com maior sombreamento (85, 75, 60, e 35% de sombreamento), os indivíduos apresentaram parênquima paliçádico com duas camadas de células, uma formada por células alongadas (3 a 4 vezes mais alta que larga) e uma camada por células curtas (até duas vezes mais altas que larga) (Fig. 5A-G). No tratamento pleno sol, os indivíduos apresentaram de duas a três camadas de parênquima paliçádico bem desenvolvido, formados por células alongadas (3 a 4 vezes mais alta que larga).

No parênquima lacunoso dos indivíduos de todos os tratamentos foram observados de quatro a cinco camadas celulares com formato irregular e arranjo compacto (Fig. 5). Entre o parênquima paliçádico e o lacunoso, ocorrem pequenos feixes acessórios, envoltos por uma espessa camada de fibras (Fig. 5C, H).

As diferenças encontradas para o parênquima nos diferentes tratamentos também foi apontada pelo teste estatístico apresentado na tabela 8, onde os indivíduos expostos a

35% de sombreamento e à pleno sol apresentaram a maior espessura do parênquima paliçádico e espessura total do parênquima, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Quanto ao parênquima lacunoso, não foi observado diferença significativa entre eles.

**Tabela 8.** Espessura do parênquima paliçádico e lacunoso ( $\mu\text{m}$ ) em indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento.

Tratamentos (sombreamento)	Espessura do Parênquima paliçádico ( $\mu\text{m}$ )	Espessura do Parênquima lacunoso ( $\mu\text{m}$ )	Espessura Total do parênquima ( $\mu\text{m}$ )
14%	116,35 $\pm$ 20,14 b	132,17 $\pm$ 16,78 a	248,53 $\pm$ 27,24 abc
25%	99,85 $\pm$ 24,54 b	129,31 $\pm$ 31,38 a	229,17 $\pm$ 42,58 c
40%	115,83 $\pm$ 22,47 b	122,50 $\pm$ 29,80 a	238,33 $\pm$ 35,82 bc
65%	141,49 $\pm$ 22,95 a	134,00 $\pm$ 16,95 a	275,50 $\pm$ 25,62 a
100%	153,57 $\pm$ 41,29 a	121,32 $\pm$ 38,38 a	274,90 $\pm$ 64,35 ab

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade.

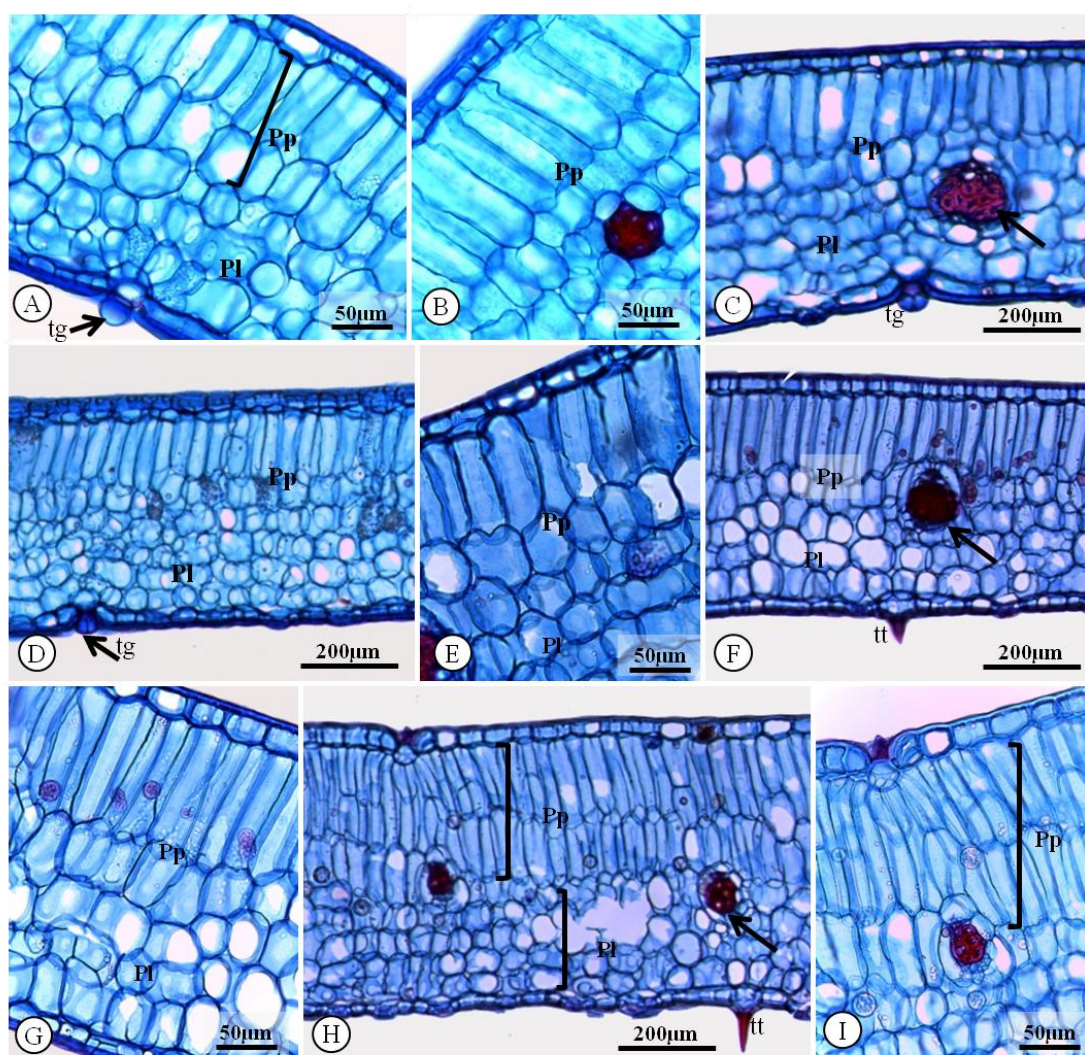
Assim como os tricomas observados no limbo, também foram relatados para a região da nervura central. Esta se apresenta biconvexa com arco abaxial mais proeminente em relação ao adaxial, apresentando de três a quatro camadas de colênquima angular em ambas as faces (Fig. 8). O parênquima cortical é constituído por células de tamanhos variados, de formato arredondado e paredes delgadas, deixando pequenos espaços intercelulares entre si.

Os feixes vasculares apresentaram variações quanto ao formato, porém este fato não foi influenciado pela luminosidade, são apenas diferenças entre os indivíduos analisados, podendo se apresentar de forma circular (Fig. 8 A, C, G, H), ou formando um arco quase fechado (Fig. 8E), caracterizando-se concêntrico anficrival, envoltos por fibras descontínuas. Da nervura central partem pequenos feixes vasculares em direção ao mesofilo (Fig. 8G, E), correspondente a área internevral. Na nervura central dos indivíduos expostos aos tratamentos de 85%, 75% e 60% apresentaram reação negativa para presença de gotículas de lipídeos. Porém nos indivíduos expostos aos tratamentos de 35% de sombreamento e pleno sol, também foram observadas gotículas de lipídeos

distribuídos principalmente na região adaxial da nervura. (Fig. 10G, I). Em relação ao amido, na nervura central, a reação foi positiva para os indivíduos de todos os tratamentos, distribuindo-se de forma semelhante em ambos os tratamentos. Os amiloplastos distribuem-se de forma contínua envolvendo o sistema vascular, formando uma bainha amilífera (Fig. 10B, D, E, H, J).

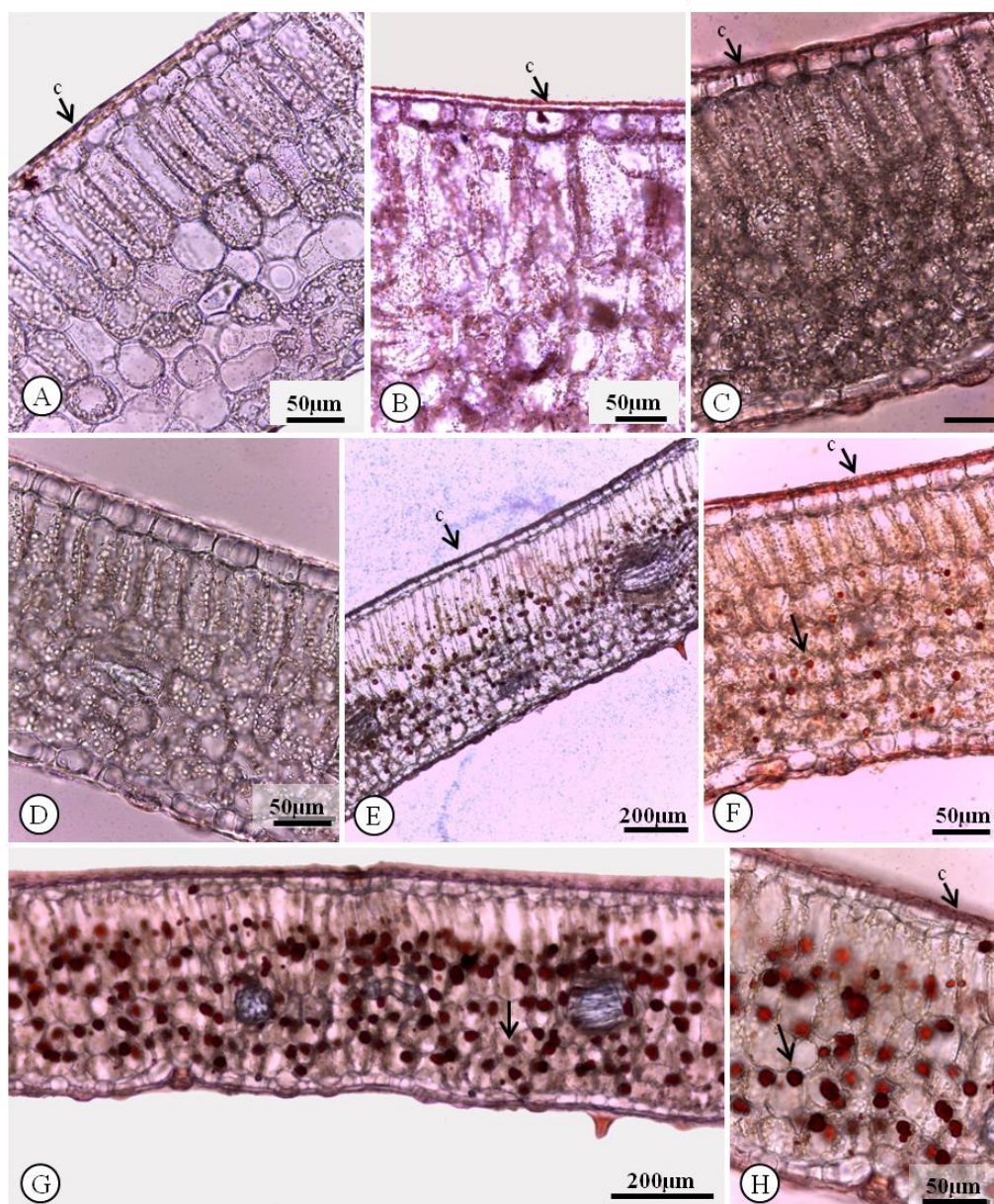
Em secções transversais, o pecíolo apresenta forma plano-convexa, exibindo na porção distal alas laterais que correspondem ao início da expansão da lâmina foliar. A epiderme é uniestratificada com células de formato quadrangulares, apresentando uma cutícula espessa (Fig. 11B, E, H, K, N). Foram observados tricomas glandulares subsésseis e tricomas tectores unicelulares com pouca frequência. Internamente à epiderme, ocorre uma faixa contínua de colênquima angular. Assim como ocorre na nervura central, o sistema vascular é formado por feixe vascular circular, e por dois feixes cilíndricos menores próximos às projeções laterais. Nos indivíduos de todos os tratamentos apresentaram reação negativa para presença de gotículas de lipídeos, exceto o tratamento pleno sol que apresentou poucos oleossomos distribuídos na região do parênquima de preenchimento (Fig. 11G, I). Quanto a distribuição dos amiloplastos, estes ocorrem de forma semelhante à nervura central, apresentando reação positiva para os indivíduos de todos os tratamentos. Além de envolverem o sistema vascular, os grãos de amido estão presentes na região parenquimática, envolvendo os feixes acessórios e distribuídos na medula (Fig. 12).





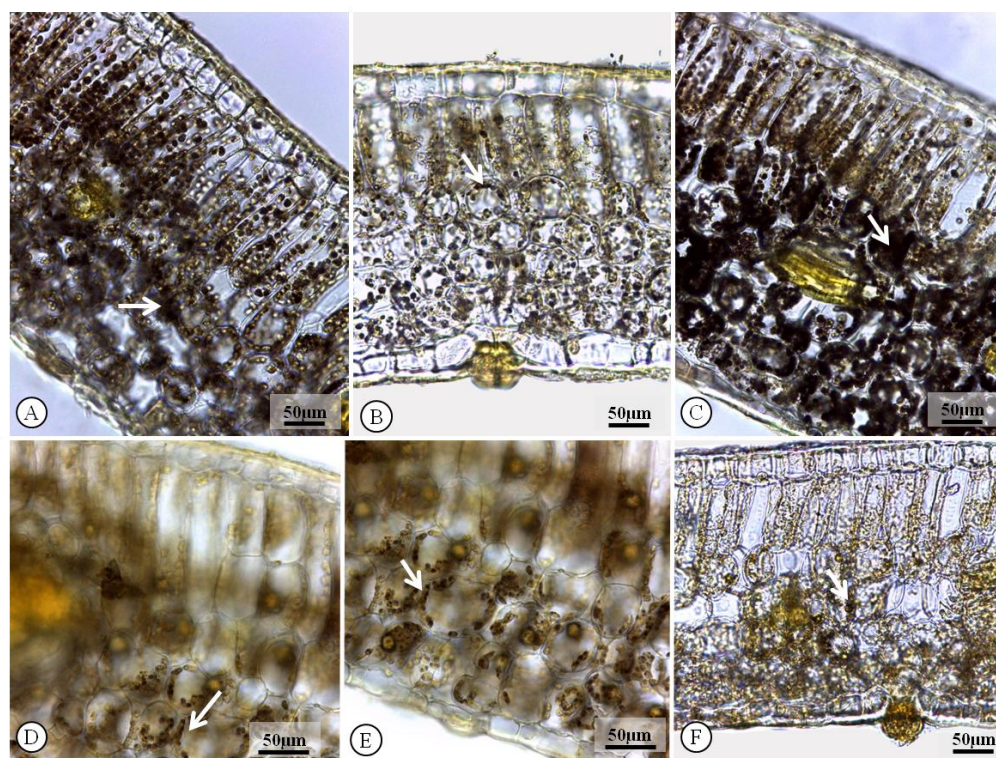
**Figura 5.** Secções transversais do limbo de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento. (A-B) 85% (C) 75% (D-E) 60% (F-G) 35% (H-I) pleno sol. **Pp**- parênquima paliçádico; **Pl**- Parênquima lacunoso; **tg**- tricoma glandular; **tt**-tricoma tector. Seta indica os feixes acessórios distribuídos no mesofilo.





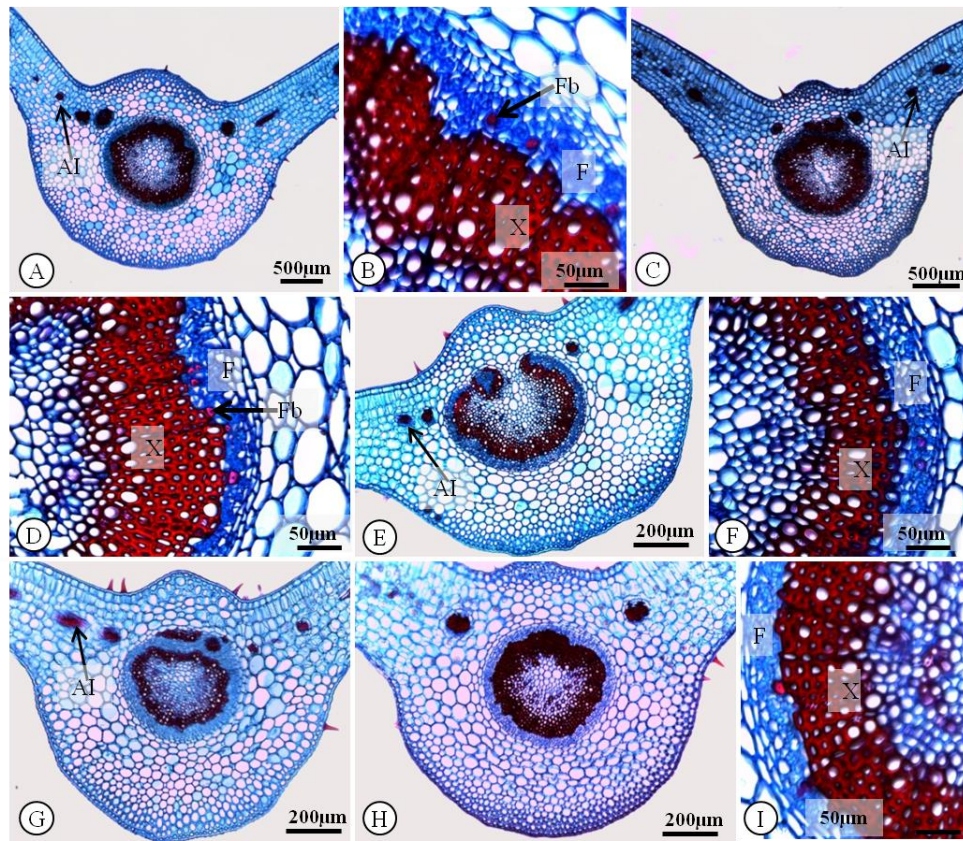
**Figura 6.** Secções transversais do limbo de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. em diferentes condições de sombreamento, submetidos ao reagente Sudan IV para detecção de lipídios totais. (A) 85% (B) 75% (C-D) 60% (E-F) 35% (G-H) Pleno sol. c- cutícula. Seta indica a reação positiva a lipídio.



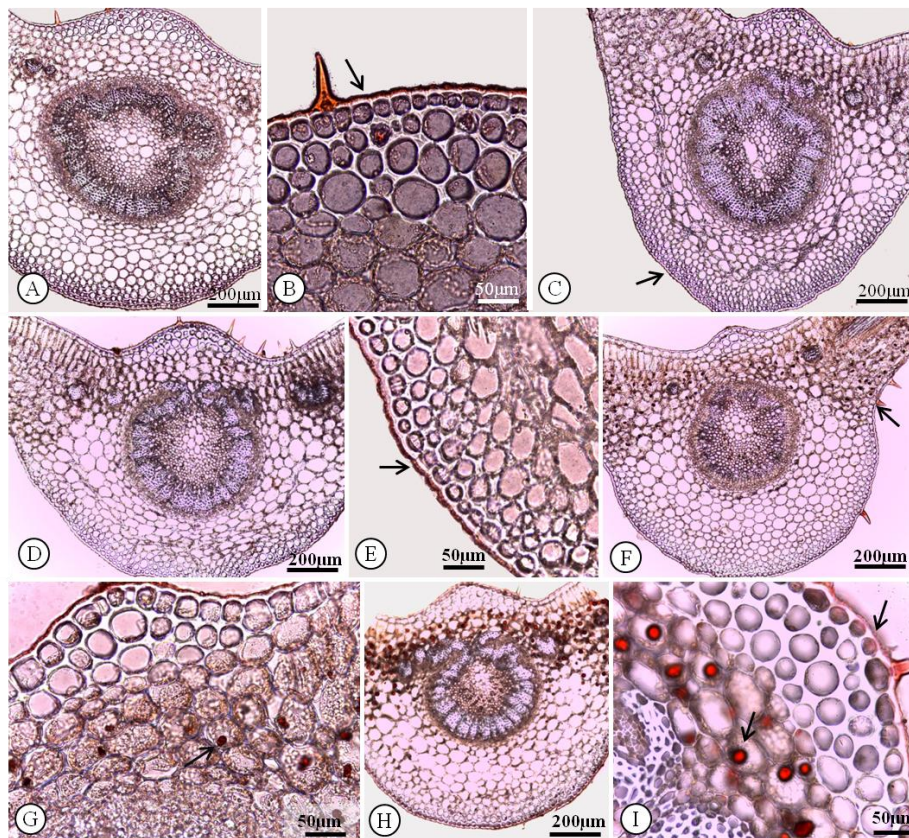


**Figura 7.** Secções transversais do limbo de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. em diferentes condições de sombreamento, submetidos a solução lugol para detecção de amido. (A) 85% (B) 75% (C) 60% (D-E) 35% (F) Pleno sol. Seta indica a reação positiva a amido.



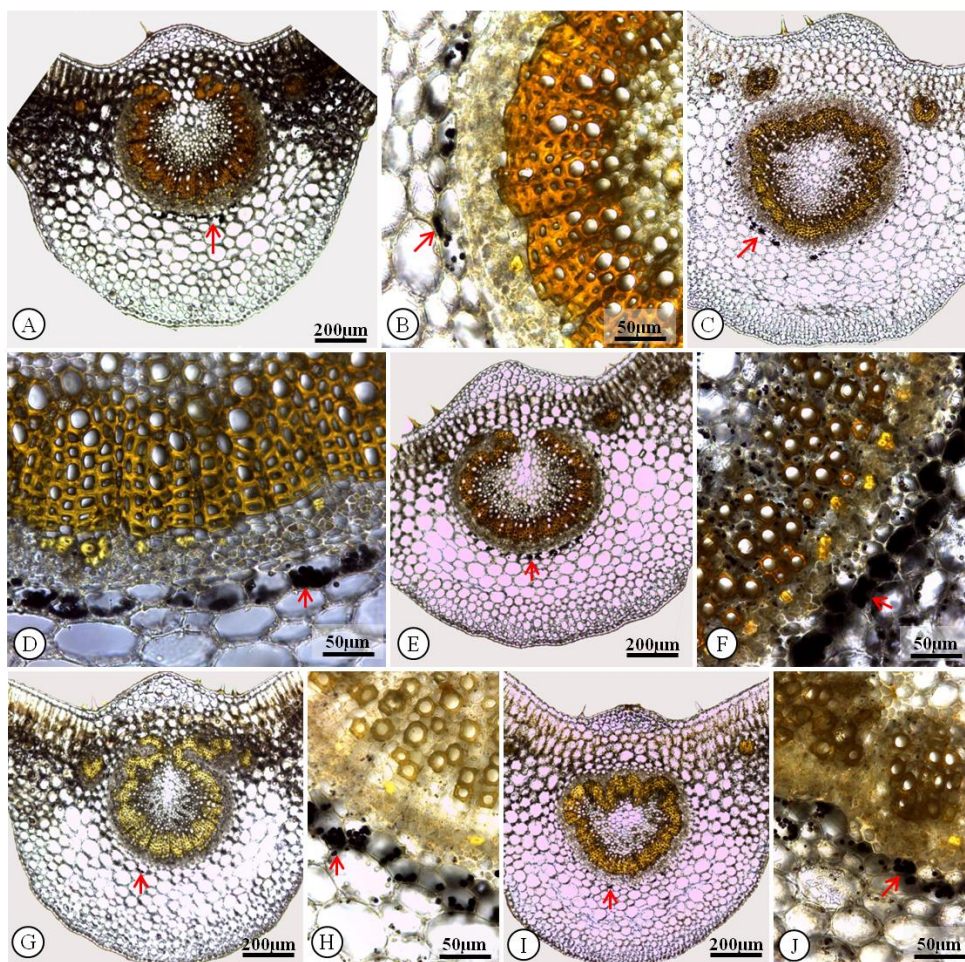


**Figura 8.** Secções transversais da nervura central de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento. (A-B) 65% (C-D) 75% (E-F) 60% (G) 35% (H-I) Pleno sol. F- floema; X- xilema; Fb- fibras; AI-área internervural indicado pela seta.



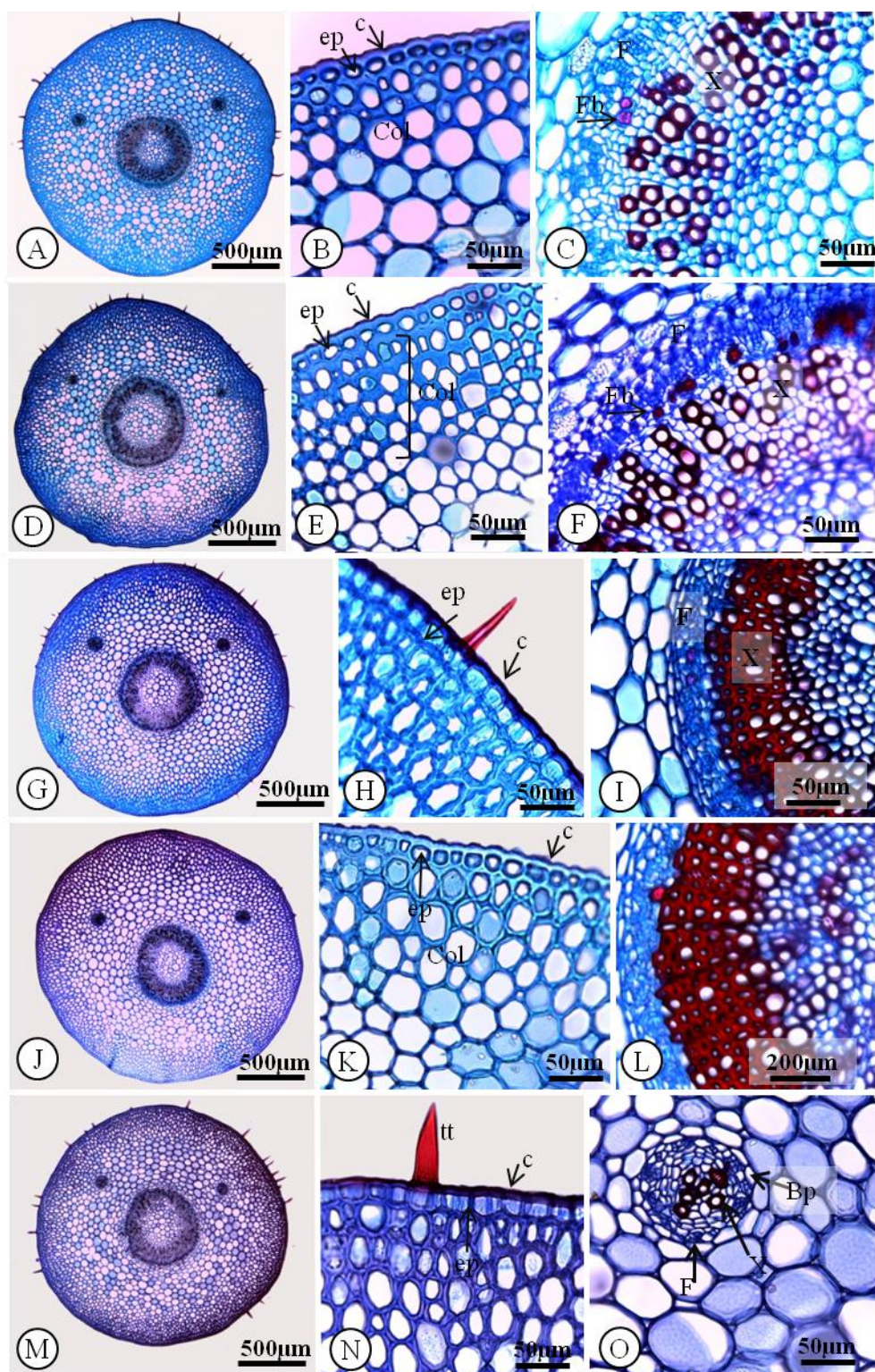


**Figura 9.** Secção transversal da nervura central de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. em diferentes condições de sombreamento, submetidos ao reagente Sudan IV para detecção de lipídios totais. (A-B) 85% (C) 75% (D-E) 60% (F-G) 35% (H-I) Pleno sol. Seta indica a reação positiva a lipídio.



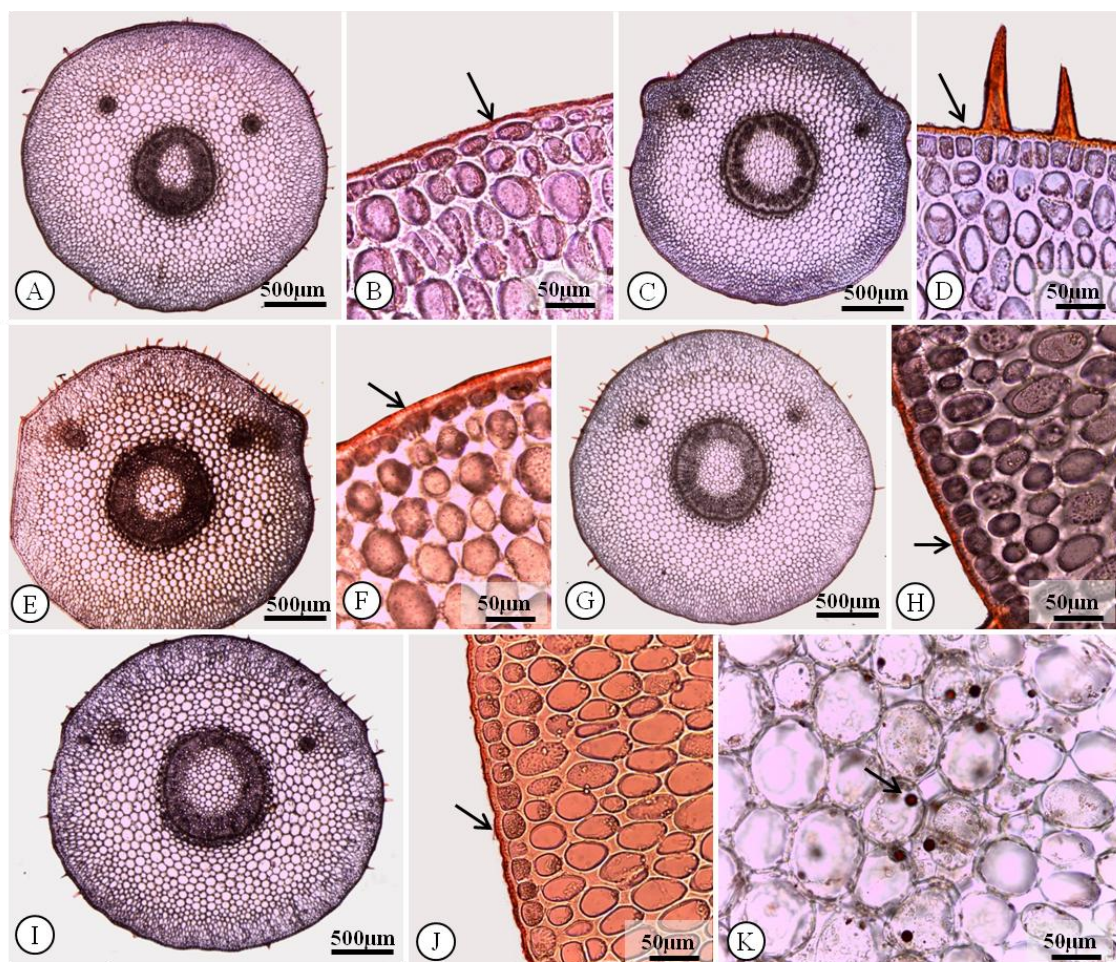
**Figura 10.** Secção transversal da nervura central de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. em diferentes condições de sombreamento, submetidos a solução lugol para detecção de amido (A-B) 85% (C-D) 75% (E-F) 60% (G-H) 35% (I-J) Pleno sol. Seta indica a reação positiva a amido.





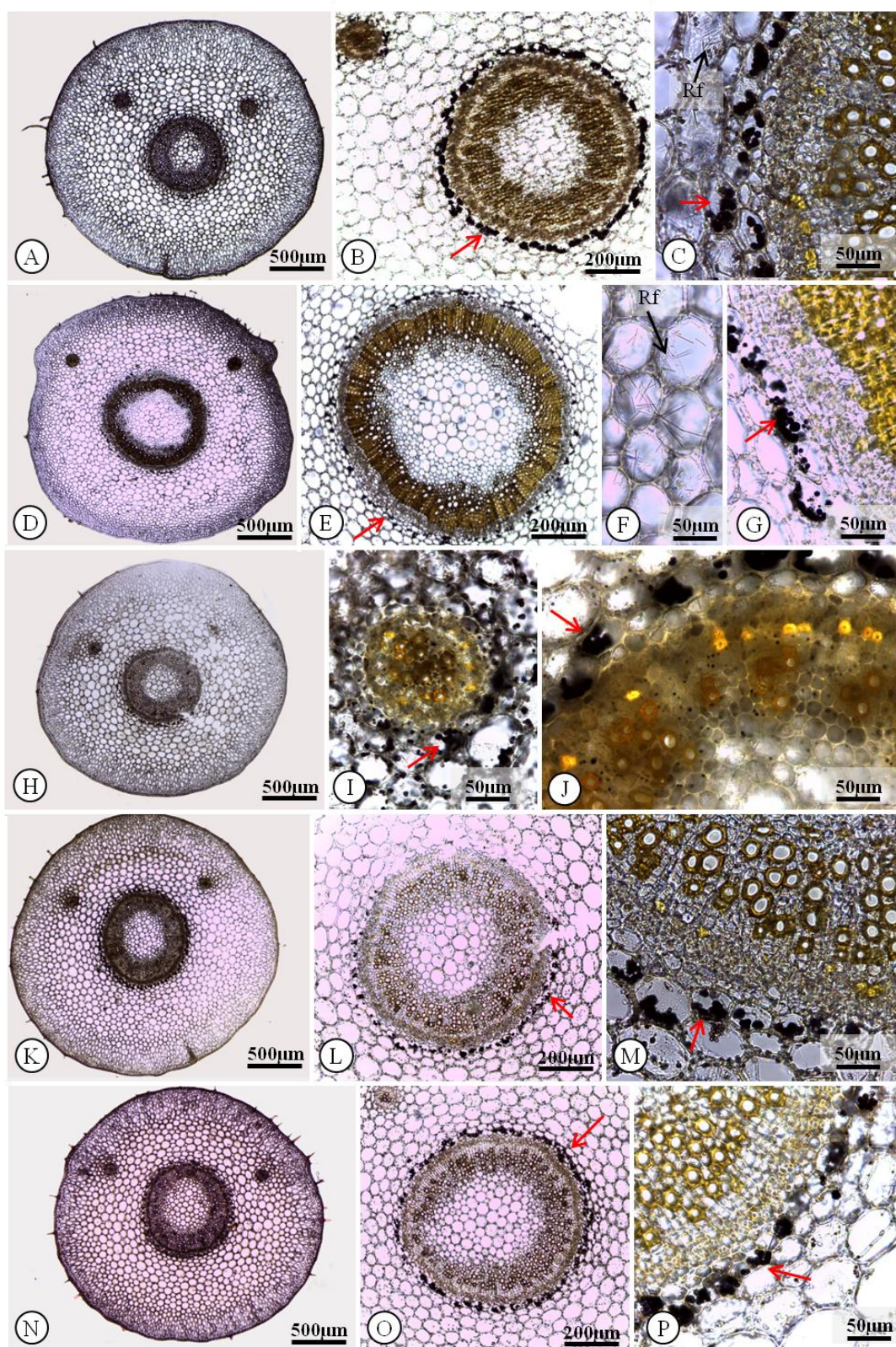
**Figura 11.** Secções transversais do pecíolo de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. submetidos a diferentes condições de sombreamento. (A-C) 85% (D-F) 75% (G-I) 60% (J-L) 35% (M-O) Pleno sol. **ep**- epiderme; **c**- cutícula; **F**-floema; **X**- xilema; **Fb**- fibras- **Fva**- feixe vascular acessório; **Bp**- bainha parenquimática.





**Figura 12.** Secção transversal do pecíolo de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. em diferentes condições de sombreamento, submetidos ao reagente Sudan IV para detecção de lipídios totais. (A-B) 85% (C-D) 75% (E-F) 60% (G-H) 35% (I-K) Pleno sol. Seta indica a reação positiva a lipídio.





**Figura 13.** Secção transversal do pecíolo de indivíduos de *A. nitida* Ness & Mart. em diferentes condições de sombreamento, submetidos a solução lugol para detecção de amido. (A-C) 85% (D-G) 75% (H-J) 60% (K-M) 35% (N-P) Pleno sol. Rf- cristais do tipo ráfides Seta indica a reação positiva a amido.

#### 4. DISCUSSÃO

Os aspectos morfológicos das folhas de *A. nitida* evidenciam estratégias que minimizam o efeito da alta luminosidade ou maximizam a captura de luz em resposta às condições ambientais. Quando se relaciona o comprimento do pecíolo, o ângulo do pecíolo em relação ao caule e a área foliar dos indivíduos expostos aos maiores níveis de sombreamento observa-se que essas relações maximizam a captura da luz.

O maior comprimento médio do pecíolo em condições de maior sombreamento, projeta as folhas para uma maior absorção de luz, diminuindo a possibilidade do auto-sombreamento (LARCHER & BOERGER, 2009).

Os dados médios de ângulo do pecíolo em relação ao caule evidenciaram que os menores ângulos foram observados nas folhas submetidas ao maior sombreamento (85%), assumindo uma posição horizontal a fim de aumentar a captura dos raios luminosos, visto que em ambientes sombreados estes são difusos e inconstantes (SMITH 1998; FALSTER & WESTBOY, 2003). Em contrapartida, plantas submetidas à intensa radiação solar, tendem a manter as folhas em uma posição vertical, assumindo os maiores ângulos do pecíolo, como observado para espécie em estudo, onde os tratamentos de 35% de sombreamento e pleno sol obtiveram as maiores médias para esse parâmetro. Essa radiação excessiva pode causar danos que podem ser minimizados por diversos mecanismos, entre eles está o posicionamento da folha em um determinado ângulo com a radiação incidente, fazendo com que ela receba menor incidência solar (LARCHER, 2000). Smith et al. (1997) e Pearcy et al. (2005) afirmam que as folhas de sol adquirem uma posição mais vertical como uma forma de proteção a fotoinibição, reduzindo a interceptação direta da luz solar.

O ângulo do pecíolo em relação ao caule neste estudo corrobora com os trabalhos de Larcher & Boerger (2009) com *Odontonema strictum* e Monteiro (2011) com *Ruellia furcata* ambas espécies de Acanthaceae e Boerger et al. (2008) com *Miconia sellowiana* (Meslastomataceae), que relataram menores ângulos do pecíolo em ambiente sombreado, contrapondo-se com os trabalhos de Niinemets & Fleck (2002) e Falster & Westoby (2003)

Não obstante, a luminosidade reduzida para as folhas expostas ao maior sombreamento, o padrão de filotaxia de Acanthaceae é decussado (folhas opostas cruzadas), sendo considerado pouco eficiente no processo de captura de luz devido ao

auto-sombreamento significativo pela posição das folhas no ramo (VALLADARES & BRITES, 2004). Entretanto, esse fato pode ser minimizado com a combinação do tamanho dos pecíolos e o ângulo do mesmo em relação ao caule. Outro fator atrelado à redução do auto-sombreamento para *Aphelandra nitida* em seu habitat natural de sub-bosque é a presença de anisofilia, ou seja, folhas de um mesmo nó com tamanhos diferentes, sendo evidenciado desde o início do desenvolvimento pós-seminal na formação da folha (abordado no capítulo 2). A anisofilia tem sido considerada uma adaptação para a captura de luz em ambientes sombreados, minimizando o sombreando pelas folhas e maximizando a captura de luz (GIVNISH, 1984).

Em relação à expansão da área foliar ocasionada pelo sombreamento, Gordon (1989), Larcher (2000) e Lima Jr. et al. (2006) ressaltam que quando a espécie tem capacidade adaptativa para compensar a deficiência de luz ocasionada pelo sombreamento, há uma expansão dessa área, o que resulta em aumento da superfície fotossintetizante, tornando possível a absorção máxima de luz. O inverso ocorre para os indivíduos submetidos a ambientes mais iluminados, ocasionando a diminuição da área foliar, o que é benéfico para a planta, uma vez que menos material foliar é exposto a eventuais danos causados pelo excesso de luz (CLAUSSEN, 1996). A área foliar é uma variável altamente plástica e dependente das condições ambientais, principalmente a luz (DAHLGREN et al., 2006). Muitos estudos têm demonstrado que os menores valores dessa variável são encontrados geralmente em condições de alta luminosidade (MARKESTEIJN et al., 2007; SARIJEVA et al., 2007; MONTEIRO, 2011; LARCHER & BOERGER, 2009), como aqui observado.

Os valores de massa fresca e seca ressaltam os resultados obtidos para os parâmetros biométricos, onde as folhas dos indivíduos expostos à pleno sol apresentaram valores médios reduzidos em relação ao comprimento, largura e área foliar, comparados aos expostos aos maiores níveis de sombreamento.

Segundo Claussen (1996), os menores valores de massa foliar em plantas de ambientes mais iluminados pode indicar que a biomassa foi distribuída mais para as raízes do que para os órgãos fotossintetizantes, permitindo maior absorção de água e nutrientes, estratégia que garantiria maior capacidade para suportar as maiores taxas de fotossíntese e transpiração que ocorrem nestes ambientes. Entretanto, os valores de massa fresca e seca das raízes expostas ao baixo sombreamento permaneceram inferiores aos indivíduos com maior sombreamento, ao contrário do observado por Monteiro (2011) para *Ruellia furcata*, onde os valores de massa da raiz aumentam com



a redução do sombreamento, bem como observado por Rego & Possamai (2006) para mudas de jequitibá cultivadas a pleno sol.

As plantas expostas a 65% de luminosidade apresentaram resultados significativos quanto a todos os parâmetros biométricos avaliados, apresentando valores médios altos comparados aos demais tratamentos, principalmente os mais sombreados que correspondem ao ambiente natural da espécie. De acordo com Valladares et al. (2002), Larcher & Borger (2009) e Larcher (2000), estes parâmetros biométricos avaliados, tais como comprimento e largura do limbo, comprimento do pecíolo e área foliar, por exemplo, se mantêm reduzidos com a redução do sombreamento. Este fato evidencia a plasticidade adaptativa da espécie a esta condição adversa ao seu habitat.

Simultaneamente às modificações morfológicas e biométricas ocasionadas pela alta luminosidade, foram observadas alterações fisiológicas no aparato fotossintético das plantas, principalmente daquelas submetidas aos tratamentos com menor sombreamento. Reduções significativas da fluorescência inicial ( $F_0$ ) no tratamento de pleno sol não era esperado, visto que inicialmente a emissão da fluorescência tende a ser maior em plantas submetidas à alta luminosidade. A fluorescência inicial é obtida quando os centros de reação do fotossistema II (FSII) encontram-se “abertos”, no qual o aceitor primário de elétrons, Quinona A, está completamente oxidado (BAKER & ROSENQVIST, 2004).

As condições ambientais onde a planta está se desenvolvendo podem, direta ou indiretamente, provocar mudanças das características de indução da fluorescência por alterar o metabolismo fotossintético (BAKER & ROSENQVIST, 2004). De acordo com Schreiber & Berry (1977), o valor de  $F_0$  é alterado por estresses do ambiente que causam alterações estruturais nos pigmentos fotossintéticos do FSII. Estresse por alta luminosidade é caracterizado por incrementar drasticamente os valores de  $F_0$ , como observado por Marengo et al. (2007) para *Coussapoa orthoneura* Standley e *Protium opacum* Swart, ao contrário do observado para este estudo. Entretanto, Dias & Marengo (2007) também encontraram decréscimos na  $F_0$  ao transferir plantas de mogno (*Swietenia macrophylla* King), de menor para maior fluxo luminoso.

Assim como observado para a fluorescência inicial, a eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ) manteve-se reduzida com o aumento da luminosidade (cerca de 0,65 e 0,64 para os tratamento de 35% de sombreamento e pleno sol, respectivamente). A capacidade fotossintética de uma planta pode ser severamente reduzida quando exposta a níveis de radiação que excedam os requeridos para saturar a

fotossíntese. Este fenômeno, chamado de fotoinibição, é um conjunto complexo de processos moleculares, definidos como a inibição da fotossíntese por luz em excesso (TAIZ & ZEIGER, 2010). A relação  $F_v/F_m$  pode variar numa faixa de 0,75 a 0,85 em plantas em condições ambientais ótimas (BELL & DUKE, 2005). A diminuição da relação  $F_v/F_m$  é um excelente indicador de efeito fotoinibitório quando as plantas estão submetidas a qualquer tipo de estresse representando uma regulação fotoprotetora (BJÖRKMAN & POWLES, 1984; ARAÚJO & DEMICINIS, 2009). Os menores valores de  $F_v/F_m$  também foram observados nas folhas de *Cordia superba* Cham. crescidas sob pleno sol (SOUZA et al., 2009).

O fluxo de energia absorvida por centro de reação (ABS/RC) manteve-se relativamente estável nos tratamentos com sombreamento intermediário (75, 60 e 35% de sombreamento), apresentando as menores médias para os tratamentos 85% de sombreamento e pleno sol. A redução neste parâmetro é considerado um mecanismos de controle ao estresse, e provavelmente são ocasionados por alteração no tamanho funcional do sistema antena do FSII, alterações no número desses complexos ou inativação dos centros de reação (RC) (EULLAFFROY et al., 2009). A inativação dos RCs pode ser uma indicação de suscetibilidade à fotoinibição, tendo em vista que o estresse diminuiu a taxa de fotossíntese, causada por um aumento na proporção de centro de reações inativos (STRASSER et al., 2004).

O fluxo de energia de dissipação por FSII ( $DI_0$  /RC) refere-se à perda de parte da energia absorvida pelo FSII, por meio de calor, emissão de fluorescência ou ainda, transferência de energia para outros sistemas (STRASSER et al., 2000). Essa dissipação foi elevada nos tratamentos com maior incidência luminosa, representados pelos tratamentos com 35% de sombreamento e pleno sol. Esse aumento da dissipação de energia explica em partes a redução da eficiência fotoquímica para estes tratamentos, pois o desvio da energia luminosa absorvida em direção a dissipação de calor causa o decréscimo da eficiência quântica (TAIZ & ZEIGER, 2010).

A dissipação de energia pode ser considerada um mecanismo de regulação da temperatura no interior da folha, e contribui para evitar a fotoinibição (SHIRKE & PATHRE, 2004). Atrelado a este fato, alterações estruturais foram observadas nas plantas submetidas aos tratamentos com maior incidência luminosa, tais como, redução da área foliar, aumento da espessura do parênquima e aumento do índice e densidade estomática, a fim de reduzir os impactos causados pelo excesso de radiação.

Em contrapartida, o índice de desempenho  $PI_{ABS}$  não diferiu entre os tratamentos. Esse índice é o mais representativo do comportamento do fluxo energético na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese (YUSUF et al., 2010). Desta forma, as alterações nesse parâmetro são um excelente indicador da atividade fotossintética ou mesmo do efeito de estresse em que as plantas estão ou ao qual foram submetidas, o que pode danificar, direta ou indiretamente, o aparato fotossintético. Tal fato demonstra a adaptabilidade da espécie ao longo do experimento frente às condições de alta luminosidade considerada estressante. A relativa estabilidade do  $PI_{ABS}$  entre os tratamentos pode ser interpretado como uma compensação por sua baixa eficiência fotoquímica apresentada nos tratamentos com menor sombreamento (OUKARROUM et al., 2007), de maneira a adaptar-se ao estresse inicial.

De acordo com os dados apresentados na tabela 4, os valores de clorofila *a* não sofreram alterações conforme o aumento do sombreamento. No entanto, os níveis de sombreamento elevados proporcionaram maiores teores de clorofila *b* em folhas de *A. nitida*. Plantas em condições de sombreamento têm demonstrado altos teores da clorofila *b*, já que essa capta energia de outros comprimentos de onda e a transfere para clorofila *a*, o que representa um efeito compensatório a menor quantidade de radiação disponível (REGO & POSSAMAI, 2006; SCALON et al., 2002; ENGEL & POGGIANI, 1991).

A relação de clorofila  $a+b$ , que representam os valores totais de clorofila, tendem a serem mais elevados em folhas de ambientes sombreados, como observado neste estudo, pois aumenta a capacidade de absorção de luz de diferentes comprimentos de onda (REID et al., 1991). O acúmulo de clorofila total nas folhas sombreadas está relacionado com a pequena quantidade de luz disponível neste ambiente, já que absorção deste recurso depende da concentração de pigmentos fotossintéticos (LARCHER, 2000). Os resultados são semelhantes aos citados na literatura (BOARDMAN, 1977; ELLSWORTH & REICH, 1992; MENDES et al., 2001), suportando as evidências de que as folhas cultivadas sob baixas intensidades de radiação apresentam teores mais altos de clorofila. O oposto ocorre com a razão clorofila  $a/b$ , que de uma maneira geral tende a diminuir com a redução da intensidade luminosa, devido uma maior proporção de clorofila *b* em ambiente sombreado, fato que ocorre devido a esta clorofila ser degradada mais lentamente, em plantas de sombra, do que a clorofila *a* (ENGEL & POGGIANI, 1991).

Os pigmentos carotenoides não sofreram alterações entre os tratamentos, sendo estes importantes substâncias que atuam no processo de proteção das plantas contra estresses ambientais. Isso ocorre a partir da degradação do  $\beta$ -caroteno, que dá início ao ciclo das xantofilas, e resulta em um eficiente mecanismo de dissipação da energia quando o aparato fotossintético está saturado energeticamente (FRANK et al., 1999; DEMMIG-ADAMS et al., 2006; LAMBERS et al., 2008).

As diferenças fisiológicas encontradas entre folhas nas condições de sombreamento adversas também são atribuídas parcialmente a diferenças na estrutura foliar (GRATANI et al., 2006). O maior diâmetro polar e equatorial, e a maior relação DP/ DE foi encontrado para o tratamento pleno sol. Segundo Khan et al. (2002), a relação entre os DP e DE fornece um bom indicativo do formato dos estômatos, na medida em que quanto maior esta relação, mais elipsóide é o formato estomático, e maior a sua funcionalidade.

Em geral, folhas com estômatos menores ocorrem em ambientes ensolarados, pois apresentam maior eficiência de uso da água e a diferença no tamanho da abertura estomática apresenta maior efeito sobre a difusão de água do que sobre a difusão de CO<sub>2</sub> (ABRAMS et al., 1994). Nery et al. (2007) relatam menores estômatos para folhas de *Calophyllum brasiliense* Cambess expostas a pleno sol. Guerra et al. (2015) relata que os folíolos *Handroanthus chrysotrichus* expostos à sombra apresentaram maior diâmetro polar, não apresentando variações quanto ao diâmetro equatorial entre sol e sombra. No entanto foi observado o inverso para o presente estudo, onde maiores estômatos foram encontrados nos tratamentos pleno sol, assim como maior densidade estomática. Segundo Salisbury & Ross (2013), este fato representa um maior controle sobre a transpiração.

A luz tem um forte efeito sobre os estômatos, proporcionando aberturas estomáticas mais amplas quando os níveis de radiação são maiores. Essa modificação oferece condições para uma redução mais rápida na transpiração por meio da regulação do fechamento estomático, possibilitando a planta reduzir a perda de água com a abertura e o fechamento de seus estômatos, quando as condições ambientais forem mais favoráveis (ROÇAS et al., 1997; KLICH, 2000; LARCHER, 2000).

O número de estômatos por unidade de área epidérmica é extremamente variável entre os indivíduos de uma mesma espécie, dependendo das condições ambientais. O

número de estômatos por unidade de área é chamado de densidade estomática, pode estar relacionado com a resposta ambiental da planta assim como acontece com o índice estomático, que representa o investimento da planta na produção de estômatos em relação ao total de células epidérmicas (CASTRO et al., 2009).

Segundo TAIZ & ZEIGER (2010), o aumento da densidade estomática, em resposta a maior disponibilidade de luz, pode ser considerado uma adaptação que aumenta a captação de CO<sub>2</sub>. Este incremento deve acompanhar o aumento da conversão de energia luminosa em energia química pela fotossíntese, que se dá em maior luminosidade. Concomitante ao maior fluxo de gás carbônico, ocorre maior fluxo de vapor de água, aumentando a transpiração. Como consequência do aumento da transpiração, ocorre um processo de resfriamento da folha, reduzindo a temperatura interna. Na ausência desta, as folhas podem ficar alguns graus mais quentes (DICKISON, 2000; SALISBURY & ROSS, 2013).

Este aumento da densidade estomática e na relação entre diâmetro polar e equatorial nos indivíduos com menor sombreamento está diretamente relacionado ao fluxo de energia de dissipação (DI<sub>0</sub> /RC) (também elevada nos indivíduos expostos ao menor sombreamento), onde o aumento da transpiração auxilia na dissipação do calor. Arelado a este fato, a máxima eficiência fotossintética representada pelos valores de Fv/Fm no tratamento com maior sombreamento, pode ser obtida por meio da formação de um menor número de estômatos por unidade de área foliar como demonstrado na tabela, que podem permanecer por mais tempo com seus ostíolos abertos, sem o risco de perda excessiva de água por transpiração.

O aumento da densidade estomática em plantas de *A. nitida* expostas as maiores condições luminosas, se assemelha ao comportamento de muitas espécies, quando submetidas à alta radiação solar, como observado para *Mikania glomerata* Sprengel (CASTRO et al., 2005), *Handroanthus chrysotrichus* (GUERRA et al., 2015), *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Calophyllaceae) (Nery et al., 2007) e *Cryptocarya aschersoniana* Mez. (Lauraceae) (ALMEIDA et al., 2004)

Comparando-se a morfoanatomia de folhas que se desenvolveram sob diferentes intensidades luminosas, verifica-se que a espessura e a área foliar tendem a ser inversamente proporcionais. A maior espessura do limbo associada a menor área foliar representa a manutenção do volume foliar (ACKERLY et al., 2000; SMITH et al.,

1997), mantendo a capacidade fotossintética da folha (CHAZDON & KAUFMANN, 1993).

Segundo Larcher (2000), o aumento no nível de luz pode proporcionar um aumento na espessura da folha devido ao alongamento e/ou adição de células do parênquima paliçádico. De acordo com Castro et al. (2009) o número de camadas celulares apresentado neste tecido é altamente influenciado por características ambientais. O incremento de camadas nesse tecido foi observado para os indivíduos expostos a 35% de sombreamento e pleno sol. Essa adição no número de camadas de parênquima paliçádico aumenta a proporção de tecido clorofiliano responsável pela fotossíntese, compensando a redução da área foliar que diminui a área fotossintetizante, principalmente para os indivíduos do tratamento ao pleno sol, os quais tiveram a área foliar reduzida significativamente.

Segundo Vogelmann et al. (1996), folhas espessas podem ser entendidas como uma aclimação às condições de alta luminosidade. Diversos estudos relatam variações anatômicas em espécies submetidas a diferentes condições de luminosidade. Para a família Acanthaceae destaca-se os trabalhos de Larcher & Boerger (2009) com *Odontonema strictum* e Monteiro (2011) com *Ruellia furcata*, em que observaram o aumento na espessura do parênquima paliçádico, bem como Guerra et al. (2015) para *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. Ex DC.) Mattos (Bignoniaceae), e Martins et al. (2008) para *Ocimum gratissimum* L.

O padrão de disposição estomática apresentado pela espécie permite que a perda de água pela transpiração seja minimizada. Nas folhas hipoestomáticas, as células-guarda dos estômatos na face abaxial respondem à incidência de luz que vem propagada da superfície adaxial, e a abertura e fechamento dos estômatos em resposta à esse processo permitiu uma melhor relação entre a disponibilidade de luz para fotossíntese o suprimento de dióxido de carbono da superfície abaxial da folha (SMITH et al., 1997). O arranjo das células do parênquima esponjoso, permite a formação de espaços entre as células, sendo importantes para o acúmulo de gases nas trocas gasosas. Desta forma, os estômatos localizados na face abaxial das folhas, podem abrir menos, reduzindo a transpiração, e grande quantidade de gases ficam retidos nesses espaços, podendo ser fixado o CO<sub>2</sub> posteriormente pelo parênquima paliçádico (CASTRO et al., 2009).

Esse padrão de disposição estomática é comumente relatado para família, como apresentado por Zottele (2014) para *Aphelandra longiflora*, *A. harleyi*, *A. espitito-santensis*, *A. squarrosa* e *A. sinclairiana*; para *Justicia wasshauseniana* Profice (ZOTTELE & AOYAMA, 2014), *J. carnea* Lindley, *J. kleinii* Wassh. & L. B. Sm. e *J. scheidweileri* V. A. W. Graham (AOYAMA & INDRIUNAS, 2013), *Odontonema strictum* Kuntze (LARCHER & BOEGER, 2006) e *Ruellia furcata* (MONTEIRO & AOYAMA, 2012). A presença de estômato tipo diacítico permite confirmar as afirmações de Ahmad (1978), Inamdar (1970) e Kumar & Paliwal (1978), dentre outros que relatam esse tipo de estômato para toda a família.

Além de acarretar alteração do aparato fotossintético das folhas, ocasionando um impacto fisiológico, a luminosidade pode alterar o metabolismo das plantas (CASTRO et al., 2003; ALMEIDA-CORTEZ et al., 2004), como observado nos indivíduos expostos a alta intensidade luminosa, nos quais apresentaram gotículas de lipídios distribuídos principalmente no mesofilo das folhas. De acordo com Figueiredo et al. (2007) e Castro et al. (2009) as reservas lipídicas encontram-se em geral, sob a forma de gotículas dispersas no citoplasma, ocorrendo menos frequentemente em folhas. As ceras e as cutículas são igualmente ricas em compostos lipídicos e seus derivados, podendo ser observado à reação positiva de lipídios para a cutícula dos indivíduos em todos os tratamentos, incluindo limbo, nervura central e pecíolo. A camada relativamente espessa de cutícula em ambas as faces, é considerada uma barreira para redução da perda de água (OLIVEIRA, 1999). Segundo Castro et al. (2009) os lipídios são uma importante forma de reserva de carbono em muitos tecidos vegetais, sendo armazenados em oleossomos, que são organelas especializadas neste tipo de armazenamento, facilmente distinguíveis e coradas com Sudan III ou IV.

Fato interessante observado para *A. nitida*, é que a presença das gotículas de lipídios foram encontradas apenas nos indivíduos expostos aos tratamentos com menores sombreamentos, como uma resposta ao estresse, ao contrário do amido, presente em todos os tratamentos, porém com menor intensidade nos indivíduos dos tratamentos de 35% de sombreamento e pleno sol. No trabalho de Oliveira et al. (2009) com *Artemisia vulgaris* L., a quantidade de grãos de amido acumulados não variou com os tratamentos, entretanto, se apresentaram maiores nos tratamentos sombreados, como observado neste trabalho.

O acúmulo de amido pode variar de acordo com o período do dia, este que é o resultante da polimerização de glicose formada nas plantas durante a fotossíntese, e à medida que os açúcares são formados, temporariamente são armazenados como amido (OLIVEIRA & AKISSUE, 2009; TAIZ & ZEIGER, 2010). Kutchan (2001) relata que o metabolismo das plantas é altamente influenciado pelo ambiente, sendo estes compostos advindos do metabolismo primário das plantas sendo frequentemente afetado por condições ambientais, tais como a luminosidade. A bainha amilífera que é encontrada próxima ao feixe vascular serve também para armazenamento, permitindo a mobilização do amido para as células do floema rapidamente, e assim possibilitando um fácil transporte para locais mais distantes da planta (CASTRO et al., 2009).

Ainda há uma discrepância quando o efeito da luminosidade no metabolismo de lipídios em plantas. Maffei et al. (1993) observaram o efeito da temperatura e luminosidade sobre o metabolismo dos lipídios em *Rosmarinus officinalis* L. Os resultados indicaram que o aumento da temperatura e luminosidade, nessa espécie ocasionou o aumento dos hidrocarbonetos epicuticulares e redução dos ácidos graxos epicuticulares e óleos essenciais. No entanto, Croteau et al. (1992) observaram que o conteúdo de óleo essencial de *Hedeoma drummondii* Benth. foi reduzido em 50% sob luminosidade baixa. Hornok (1992) verificou que a sombra reduz significativamente o conteúdo de óleo volátil de *Mentha piperita* L..

Os trabalhos que abordam compostos lipídicos relacionados às condições luminosas, são comumente observados para espécies medicinais, analisando e quantificando principalmente os óleos essenciais, como observado nos trabalhos de Maffei et al. (1993), Lima et al. (2003), Pegoraro (2007) e Araújo (2014), sendo restritos os trabalhos histoquímicos com espécies nativas principalmente em respostas a diferentes condições de luminosidade.

De modo geral, os resultados relacionados aos diferentes níveis de sombreamento em plantas de *A. nitida* evidenciaram diferentes estratégias de desenvolvimento, demonstrando a capacidade da espécie *A. nitida* em se aclimatar a diferentes condições, inclusive em ambientes de luminosidade contrastantes. Segundo Pinto et al. (2007), cada espécie responde de maneira distinta ao sombreamento. Isto indica o potencial de plasticidade fenotípica desta espécie, entendida como a capacidade de um dado genótipo produzir diferentes fenótipos sob diferentes condições ambientais (VALLADARES et al., 2005).



Apesar desta plasticidade demonstrada pela espécie, os resultados indicaram que os tratamentos testados não oferecem as mesmas condições favoráveis para o desenvolvimento da espécie, sendo as condições ideais entre 75 e 35% de sombreamento, no qual a espécie obteve o melhor desempenho. Por outro lado, plantas submetidas ao pleno sol desenvolveram estratégias para contornar o estresse, observando alterações fisiológicas no aparato fotossintético, ressaltando a redução na eficiência fotoquímica, sendo compensada por uma maior dissipação de calor, e investindo em adaptações estruturais, como a redução da área foliar, aumento na espessura do parênquima paliçádico, aumento na densidade estomática e compostos lipídicos no mesófilo.

As respostas plásticas das plantas são importantes do ponto de vista ecológico, assim como a magnitude dessas respostas. A interação entre a heterogeneidade ambiental e a plasticidade permite que as plantas explorem nichos mais ricos em recursos e ampliem suas possibilidades de distribuição, principalmente em ambientes heterogêneos (CARDOSO & LOMÔNACO, 2003).

## CONCLUSÃO

- As condições de sombreamento aos quais as plantas foram submetidas influenciaram fortemente os parâmetros avaliados.
- As plantas mostraram-se tolerantes ao pleno sol, observando alterações no aparato fotossintético como a redução na eficiência fotoquímica, sendo compensada por uma maior dissipação de calor e investindo em adaptações estruturais, como a redução da área foliar, aumento na espessura do parênquima paliçádico, aumento na densidade estomática e compostos lipídicos no mesófilo.
- Para *A. nitida*, verificou-se que o sombreamento na faixa de 75 à 35% mostrou-se o mais indicado para o cultivo da espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, M.D.; MOSTOLLER, S.A. Gas exchange, leaf structure and nitrogen in contrasting successional tree species growing in open and understory sites during a drought. **Tree Physiology**, v.15, n.6, p. 361-370.1995.

- ACKERLY, D. D. DUDLEY, S. A.; SULTAN, S. E.; SCHMITT, J.; COLEMAN, J. S.; LINDER, C. R.; SANDQUIST, D. R.; GEBER, M. A.; EVANS, A. S.; DAWSON, T. E.; LECHOWICZ, M. J. The evolution of plant ecophysiological traits: recent advances and future directions. **BioScience**, v. 50, p. 979-995. 2000.
- ADAMS, W. W, MULLER, O, COHU, C. M.; DEMMIG-ADAMS, B. May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? **Photosynthesis Research**, v. 117, n. 1, p. 31-44. 2013.
- AGUIAR, T.V.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; AZEVEDO, A. A.; FERREIRA, R.S. ANATI QUANTI: Software de análises quantitativas para estudos em Anatomia Vegetal. **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 649-659. 2007.
- AHMAD, K. J. Epidermal hairs of Acanthaceae. **Blumea**, v. 24, p. 101-117. 1978.
- ALMEIDA, L.P.; ALVARENGA, A.A. de; CASTRO, E.M. de; ZANELA, S.M.; VIEIRA, C.V. Crescimento inicial de plantas de *Cryptocaria aschersoniana* Mez. submetidas a níveis de radiação solar. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p. 83-88. 2004.
- ALMEIDA-CORTEZ, J. ; SHIPLEY, B.; ARNASON, J. T. Growth and chemical defense in relation to resource availability: tradeoffs or common responses to environmental stress? **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 2, p. 187-194. 2004.
- AOYAMA, E. M.; INDRIUNAS, A. Morfoanatomia foliar de três espécies de *Justicia* L. (Acanthaceae). **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.17, p. 2833-2844. 2013.
- ARAÚJO, L. L. N. Características morfofisiológicas, produção e composição de óleo essencial em folhas de *Tetradenia riparia* (Hochst) Codd- Lamiaceae cultivada em diferentes níveis de sombreamento. Dissertação de Mestrado (Programa de Biodiversidade Vegetal) Universidade Federal de Goiás. 2014. 81p.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B.B. Fotoinibição da Fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, p. 463-472. 2009.
- ARNOTT, H.J. Leaf clearings. **Turtox News**, v.37, n.8, p.192-4. 1959.

- BAKER, N. R., ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.403, p.1607-1621. 2004.
- BALL, M. C.; BUTTERWORTH, J. A.; RODEN, J. S.; CHRISTIAN, R.; EGERTON, J. J. G. Applications of chlorophyll fluorescence to Forest ecology. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p. 311-319. 1994.
- BALLARE, C. L. Light Regulation of Plant Defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. p. 65, p.1-29. 2014.
- BELL, A. M.; DUKE, N. C. Effects of photosystem II inhibiting herbicides on mangroves – preliminary toxicology trials. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, p.297-307. 2005.
- BJÖRKMAN, O.; POWLES, S. B. 1984. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. **Planta**, v.161, p. 490-504. 1984.
- BOARDMAN, N. K. Comparative Photosynthesis of sun and shade Plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.28, p.355-77. 1977.
- BOEGER, M. R. T.; GLUZEZAK, R. M.; PIL, M. W.; GOLDENBERG, R.; MEDRI, M. Variabilidade morfológica foliar de *Miconia sellowiana* (DC.) Naudin (Melastomataceae) em diferentes fitofisionomias no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.3, p.443-452. 2008.
- CARDOSO, G.L. & LOMÔNACO, C. Variações fenotípicas e potencial plástico de *Eugenia calycina* Cambess (Myrtaceae) em uma área de transição cerrado vereda. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n.131-140. 2003.
- CASTRO, E. M de.; PINTO, J. E. B. P.; ALVARENGA, A. A.; LIMA Jr., E. C.; BERTOLUCCI, S. K. V.; SILVA-FILHO, J. L.; VIEIRA, C. V. Crescimento e anatomia foliar de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) submetidas a diferentes fotoperíodos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1293-1300. 2003.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal**: Estrutura e função de órgão vegetativos. Lavras: UFLA, 2009, 234p.
- CASTRO, E.M.; PINTO, J.E.B.P.; MELO, H.C.; SOARES, A.M.; ALVARENGA, A.A.; LIMA JÚNIOR, E.C. Aspectos anatômicos e fisiológicos de plantas de

- guaco submetidas a fotoperíodos. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.3, p.846-850. 2005.
- CHAZDON, R. L.; KAUFMANN, S. Plasticity of leaf anatomy in relation to photosynthetic light acclimation. **Functional Ecology**, v. 7, p. 385-394. 1993.
- CHEN S., KANG Y., ZHANG M., WANG X., STRASSER R.J., ZHOU B., QIANG S. Differential sensitivity to the potential bioherbicide tenuazonic acid probed by the JIP-test based on fast chlorophyll fluorescence kinetics. **Environmental and Experimental Botany**, v.112, p.1-15. 2015.
- CLAUSSEN, J. W. Acclimation abilities of three tropical rainforest seedlings to an increase in light intensity. **Forest Ecology and Management**, v. 80, p. 245-255. 1996.
- CROTEAU, R. Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils. In: CRAKER, L.E.; SIMON, J.E. (eds.) **Herbs, spices, and medicinal plants-Recent advances in botany, horticulture and pharmacology**. The Haworth Press, Inc.: New York, 1992. p. 81-131.
- CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. Parte I -Células e tecidos. 2.ed. São Paulo: Roca, 1986. p. 304
- DAHLGREN, J.P.; ERIKSSON, O.; BOLMGREN, K.; STRINDELL, M. & EHRLÉN, J. Specific leaf area as a superior predictor of changes in field layer abundance during forest succession. **Journal of Vegetation Science**, v.17, p. 577-582. 2006.
- DEMMIG-ADAMS B., ADAMS W.W.III., MATTOO A. **Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment**. Advances in Photosynthesis and Respiration. Dordrecht: Springer, 2006.
- DIAS, D. P.; MARENCO, R. A. Fotossíntese e fotoinibição em mogno e acariquara em função da luminosidade e temperatura foliar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.3, p.305-311. 2007.
- DICKISON, W. C. **Integrative Plant Anatomy**. San Diego: Harcourt Academic Press, 2000.
- ELLSWORTH, D. S.; REICH, P. B. Leaf mass per area, nitrogen content and photosynthetic carbon gain in *Acer saccharum* seedlings in contrasting forest light environments. **Functional Ecology**, v. 6, p. 423-435. 1992.

- ENGEL, V. L. **Influência do sombreamento sobre o crescimento de mudas de essências nativas, concentração de clorofila nas folhas e aspectos de anatomia.** Dissertação (Mestrado)- ESALQ- Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1989, 202p.
- ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 3, n. 1, p. 39-45. 1991.
- EULLAFFROY, P.; FRANKART, C.; AZIZ, A.; COUDERCHET, M, BLAISE, C. Energy fluxes and driving forces for photosynthesis in *Lemna minor* exposed to herbicides. **Aquatic Botany**, v.90, p.172-178. 2009.
- FALSTER, D. S.; WESTOBY, M. Leaf size and angle vary widely across species: what consequences for light interception? **New Phytologist**, v.158, p. 509-525. 2003.
- FIGUEIREDO, A. C. S.; BARROSO, J. M. G.; PEDRO, L. M. G.; ASCENSÃO, L. **Histoquímica e citoquímica em plantas:** princípios e protocolos. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007.
- FRANK H. A., YOUNG A.J., BRITTONG., COGDELL R.J. The photochemistry of carotenoids. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol. 8. Dordrecht: Kluwer Academic, 1999.
- GÁLVEZ, D. & PEARCY, R.W. Petiole twisting in the crowns of *Psychotria limonensis*: implications for light interception and daily carbon gain. **Oecologia**, v. 135, p. 22-29. 2003.
- GIVNISH, T. J. Leaf and canopy adaptations in tropical forests. in: MEDINA, E.; MOONEY, H. A.; VA´SQUEZ-YA´NES, C (eds). **Physiological ecology of plants of the wet Tropics.** Junk, The Hague, 1984.
- GORDON, J. C. Effect of shade on photosynthesis and dry weight distribution in yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) seedlings. **Ecology**, v. 50, n. 5, p. 924-926. 1989.

- GRATANI, L.; COVONE, F.; LARCHER, W. Leaf plasticity in response to light of three evergreen species of the Mediterranean maquis. **Trees**, n. 20, p. 549-558. 2006.
- GUERRA, A.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, L. G.; MEDRI, C. Morfoanatomia de folhas de sol e de sombra de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos (Bignoniaceae). **Revista de Saúde e Biologia**, v.10, n.1, p.59-71. 2015.
- HORNOK, L. **Cultivation and Processing of Medicinal Plants**. Wiley, New York, 1992, 337p.
- INAMDAR, J. A. Epidermal structure and ontogeny of Caryophyllaceous stomata in some Acanthaceae. **Botanical Gazette**, v.131, n.4, p. 261-268. 1970.
- JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. McGraw- Hill, New York, 1940.
- JORDÃO, L. R., LOPES, V. B.; TAKAKI, M. Selection of viable seeds in *Hormidium coriaceum* Ldl. (Orchidaceae) by density separation. **Seed Science and Technology**, v.16, n.2, p. 515- 519. 1988.
- KHAN, P.S.S.V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.71, n.2, p.141-146, 2002.
- KLICH, M.G. Leaf variations in *Elaeagnus angustifolia* related to environmental heterogeneity. **Environmental and Experimental Botany**, v.44, p.171-183. 2000.
- KOLLMANN, L. J. C.; FONTANA, A.P.; SIMONELLI, M.; FRAGA, C.N. As Angiospermas ameaçadas de extinção no Estado do Espírito Santo. In: SIMONELLI, M.; FRAGA, C. N. (Org.). **Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo**. Vitória: Ipema, 2007. p. 108-112.
- KUMAR, S.; PALIWAL, G. S. Foliar anatomy of the family Acanthaceae I. The tribe Justiceae. **Bulletin of the Botanical Survey of India**, v. 20, p. 54-63. 1978.
- KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 58-60. 2001.

- LAMBERS H., CHAPIN III., F.S., PONS T.L. **Plant Physiological Ecology**. 2 ed. Springer, 2008. 604 p.
- LARCHER, L.; BOEGER, M.R.T. Arquitetura foliar de *Odontonema strictum* (Nees) O. Kuntze (Acanthaceae) em duas condições de luminosidade, **Hoehnea**, v. 36, n.2, p. 321-327. 2009.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531p.
- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigment photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p. 362-385.1987.
- LIMA JR., E. C., ALVARENGA, A. A., CASTRO, E. M.; VIEIRA, C. V.; BARBOSA, J. P. R. A. D. Aspectos fisiológicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. *Revista Árvore*, v.30, n.1, p.33-41. 2006.
- LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n.2, p.71-77. 2003.
- LUQUE, R.; SOUZA, C. H.; KRAUS, E. J. Métodos de coloração de Roeser (1972) - modificado - e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alcião 8gs ou 8gx. **Acta Botânica Brasilica**, v.10, n.2, p.199-212. 1996.
- MAFFEI, M.; MUCCIARELLI, M.; SCANNERINI, S. Environmental Factors Affecting the Lipid Metabolism in *Rosmarinus officinalis* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.21, n.8, p.765-784. 1993.
- MARENCO, R. A.; NEVES, T. S.; CAMARGO, M. A. B.; DIAS, D. P.; COSTA, G. F.; RODRIGUES, J. C. Fotoinibição dinâmica da fotossíntese em árvores de dossel da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p.150-152. 2007.
- MARKESTEIJN, L.; POORTER, L.; BONGERS, F. Light-dependent leaf trait variation in 43 tropical dry forest tree species. **American Journal of Botany**, v.94, n.4, p. 515-525. 2007.
- MARTINS, J. R.; ALVARENGA A. A.; CASTRO, E. M, SILVA, A. P. O.; OLIVEIRA, C.; ALVES, E. Anatomia foliar de plantas de alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, v.38, n.9, p.1-6. 2008.

- MENDES, M.M. GAZARINI, L.C.; RODRIGUES, M.L. Acclimation of *Myrtus communis* to contrasting Mediterranean light environments - effects on structure and chemical composition of foliage and plant water relations. **Environmental and Experimental Botany**, v.45, n.2, p.165-178. 2001.
- MENEZES, L. F. T.; ARAÚJO, D. S. D. Formações vegetais da Restinga da Marambaia. In **História Natural da Marambaia**. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005, p.67-120.
- MONTEIRO M. M.; AOYAMA E.M. Morfoanatomia foliar de *Ruellia furcata* (Nees) Lindau (Acanthaceae). **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n.14, p. 735-750. 2012.
- MONTEIRO, M. M. Arquitetura foliar e Caracterização anatômica de *Ruellia furcata* (Nees) Lindau (Acanthaceae) sob diferentes condições de luminosidade. Monografia não publicada, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus. 79 p. 2011.
- NERY, F. C.; ALVARENGA, A. A.; JUSTO, C. F.; CASTRO. E. M.; SOUZA, G. S.; ALVES, E. Aspectos Anatômicos de Folhas de Plantas Jovens de *Calophyllum brasiliense* Cambess. Submetidas a Diferentes Níveis de Sombreamento. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 129-131. 2007.
- NIINEMETS, U.; FLECK, S. Petiole mechanics, leaf inclination, morphology, and investment in support in relation to light availability in the canopy of *Liriodendron tulipifera*. **Oecologia**, v.132, p. 21-33, 2002.
- OELZE, M. L.; VOGEL, M. O.; ALSHARAF, K.; KAHMANN, U.; VIEHHAUSER A.; MAURINO, V. G.; DIETZ K. J. Efficient acclimation of the chloroplast antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana* leaves in response to a 10- or 100-fold light increment and the possible involvement of retrograde signals. **Journal of Experimental Botany**, n. 63, p. 1297-1313. 2012.
- OLIVEIRA, A. F. M. Química e ecofisiologia de ceras epicuticulares de espécies brasileiras da caatinga e cerrado. 93 f. Tese (Doutorado em Botânica), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica e de morfologia vegetal**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.



- OLIVEIRA, M. I.; CASTRO, E. M.; COSTA, L. C. B.; OLIVEIRA, C. Características biométricas, anatômicas e fisiológicas de *Artemisia vulgaris* L. cultivada sob telas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, v.11, n.1, p.56-62. 2009.
- ORT, D. R. When there is too much light. **Plant Physiology**, v. 125, p. 29-32. 2001.
- OUKARROUM A., MADIDI S.E., SCHANSKER G., STRASSER R.J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, n. 438-46. 2007.
- OUKARROUM, A., R. J. STRASSER, G. SCHANSKER. Heat stress and the photosynthetic electron transport chain of the lichen *Parmelina tiliacea* (Hoffm.) Ach. in the dry and the wet state: differences and similarities with the heat stress response of higher plants. **Photosynthesis Research**, v. 111, p. 303-314. 2012.
- PAIVA, J. G.A.; FANK-DE-CARVALHO, S. M.; MAGALHÃES, M. P.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500â: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta Botânica Brasílica*, v.20, n.2, p. 257-264.2006.
- PEARCY, R.W., MURAOKA, H. & VALLADARES, F. Crown architecture in sun and shade environments: assessing function and trade-offs with a tree-dimensional simulation model. **New Phytologist**, 166: 791-800. 2005.
- PEARSE, A.G. E. **Histochemistry**: theoretical and applied. 3. Ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1972.
- PEGORARO, R. L. Avaliação do crescimento e produção de óleos essenciais em plantas de *Mentha x piperita* L. Var. Piperita (Lamiaceae) submetidas a diferentes níveis de luz e nutrição. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal) Universidade Federal de Santa Catarina. 2007. 59p.
- PEREIRA, D.C., BARROS C.F.; SACARANO, F. R. *In situ* variation in leaf anatomy and morphology in two neighboring but contrasting light environments in a Brazilian sandy coastal plain. **Acta Botânica Brasílica**, v.23, n.1, p.267-273. 2009.

- PIMENTEL, T. F.; SILVA, A. G. A população de *Gaylussacia brasiliensis* na vegetação arbustiva aberta na Área de Proteção Ambiental de Setiba, Guarapari, ES. **Natureza on line**, v. 9, p. 76-81. 2011.
- PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, J.C.W.; CASTRO, E.M.; BERTOLUCCI, S.K.; MELO L.A.; DOUSSEAU S. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-Brasil em função de níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, v.25, p. 210-214. 2007.
- PORCAR-CASTELL, A.; TYYSTJÄRVI, E.; ATHERTON, J.; VAN DER TOL, C.; FLEXAS, J.; PFÜNDEL, E.; MORENO, J.; FRANKENBERG, C.; BERRY, J. A. Linking chlorophyll-a fluorescence to photosynthesis for remote sensing applications: mechanisms and challenges. **Journal of Experimental Botany**, v.65. n.15. p. 4065–4095. 2014.
- PROFICE, S. R.; KAMEYAMA, C.; CÔRTEZ, A. L. A.; BRAZ, D. M.; INDRIUNAS, A.; VILAR, T.; PESSOA, C.; EZCURRA, C.; WASSHAUSEN, D. 2016. Acanthaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000033> (27/03/2016).
- REGO, G. M.; POSSAMAI, E. Efeito do sombreamento sobre o teor de clorofila e crescimento inicial do Jequitibá-rosa. **Boletim de pesquisa florestal**, n. 53, p. 170-195. 2006.
- REID, D.M.; BEALL, F.D.; PHARIS, R.P. Environmental Cues in Plant Growth and Development. In: STEWARD, F.C. (Ed.). **Plant Physiology**. San Diego: Academic Press Inc, 1991. p. 65-181.
- ROÇAS, G., BARROS, C.F.; SCARANO, F.R. Leaf anatomy plasticity of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) under distinct light regimes in a Brazilian montane Atlantic rain forest. **Trees**, v.11, p.469-473.1997.
- SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Fisiologia das Plantas**. 4ed. Editora Cengage Learning, 2013, 774p.
- SANTOS, U. F.; XIMENES, F. S.; LUZ, P. B.; JÚNIOR, S. S.; PAIVA SOBRINHO, S. Níveis de sombreamento na produção de mudas de pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale*). **Journal Bioscience**, v. 30, n. 1, p. 129-136. 2014.

- SARIJEVA, G.; KN, APP, M.; LICHTENTHALER, H.K. Differences in photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid levels, and in chlorophyll fluorescence parameters in green sun and shade leaves of *Ginkgo* and *Fagus*. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p. 950-955. 2007.
- SCALON, S. de. P. Q.; MUSSURY, R. M.; RIGONI, M. R.; VERALDO, F. Crescimento inicial de mudas de espécies florestais nativas sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, v. 26, n. 1, p. 1-5. 2002.
- SCHREIBER, U.; BERRY, J. A. Heat-Induced Changes of Chlorophyll Fluorescence in Intact Leaves Correlated with Damage of the Photosynthetic Apparatus. **Planta**, v.136, p. 233-238. 1977.
- SHIRKE, P. A.; PATHRE, U. V. Influence of leaf-to-air vapour pressure deficit (VPD) on the biochemistry and physiology of photosynthesis in *Prosopis juliflora*. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2111-2120. 2004.
- SMITH, W. K., VOGELMANN, T. C., DELUCIA E. H., BELL D. T. & SHEPHERD K. A. Leaf form and photosynthesis: do leaf structure and orientation interact to regulate internal light and carbon dioxide? **Bioscience**, v.47, p.785–793. 1997.
- SMITH, W. K.; BELL, T. O.; SHEPHERD, K. A. Associations between leaf structure, orientation, and sunlight exposure in five Western Australian communities. **American Journal of Botany**, v. 85, p. 56-63. 1998.
- SOUZA, G. M.; BALMANT, B. D.; VÍTOLO, H. F.; GOMES, K. B. P.; FLORENTINO, T. M.; CATUCHI, T. A.; VIEIRA, W. L. Estratégias de utilização de luz e estabilidade do desenvolvimento de plântulas de *Cordia superba* Cham. (Boraginaceae) crescidas em diferentes ambientes luminosos. **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, n.2, p. 474-485. 2009.
- STRASSER B. J.; STRASSER R. J. Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: The JIP-test. In: P. Mathis (Ed.); **Photosynthesis: from Light to Biosphere**. Springer Netherlands, 1995.
- STRASSER R.J., SRIVASTAVA A., TSIMILLI-MICHAEL M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M (ed) *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*. Taylor and Francis, London, pp 445-483, 2000.

- STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the Chlorophyll a fluorescence transient. In: PAPAGEORGIOU, C.; GOVINDJEE, R. (Ed.). **Chlorophyll Fluorescence: a signature of photosynthesis**. Dordrecht: Springer, 2004. p. 321-362.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 719 p.
- TERASHIMA, I.; HANBA, Y. T.; THOLEN, D.; NIINEMETS, Ü. Leaf functional anatomy in relation to photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 108-116. 2011.
- VALLADARES, F. & BRITES, D. Leaf phyllotaxis: Does it really affect light capture? **Plant Ecology**, v. 174, p.11-17. 2004.
- VALLADARES, F.; ARRIETA, S.; ARANDA, I.; LORENZO, D.; SÁNCHEZ GÓMEZ, D.; TENA, D.; SUÁREZ, F.; PARDOS, J. A. Shade tolerance, photoinhibition sensitivity and phenotypic plasticity of *Ilex aquifolium* in continental Mediterranean sites. **Tree Physiology**, v. 25, p. 1041-1052. 2005.
- VALLADARES, F.; GIANOLI, E.; GÓMEZ, J. M. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. **New Phytologist**, v. 76, p. 749–763. 2007.
- VALLADARES, F.; SKILLMAN, B.J.; PEARCY, R.W. Convergence in light capture efficiencies among tropical forest understorey plants with contrasting crown architectures: a case of morphological compensation. **American Journal of Botany**, v.89, p.1275-1284. 2002.
- VIEIRA, G. **Gap dynamics in managed Amazonian forest: Structural and ecophysiological aspects**. Tese (Doutorado em Ecologia Tropical) - University of Oxford, Grã-Bretanha.162f. 1996.
- VOLGELMANN, T. C.; NISHIO, J. N.; SMITH, W. K. Leaves and light capture: light propagation and gradients of carbon fixation within leaves. **Trends in Plant Science**, v. 1, n.1, p. 65-70. 1996.
- YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE, SARIN, N. B. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1797, p.1428-1438. 2010.

ZOTTELE, L. 2013. Morfoanatomia de folhas, brácteas e pétalas de seis espécies de *Aphelandra* R. Br. (Acanthaceae). Monografia não publicada, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus. 81 p.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro trabalho que explora as formas de propagação sexuada e assexuada de *Aphelandra nitida*, proporcionando informações para conservação *ex situ*, visto que a espécie encontra-se vulnerável a extinção no Espírito Santo. Desta maneira, a melhor forma de propagar vegetativamente a espécie, é utilizando estacas basais. Para a propagação sexuada em laboratório, recomenda-se a utilização de substrato sobre papel.

A dificuldade de obtenção das sementes, devido às características morfológicas dos frutos, torna a estaquia uma forma viável de propagação vegetativa da espécie.

Os aspectos morfológicos dos frutos e sementes de *A. nitida*, assim como as análises ultraestruturais das sementes, possibilitam uma maior compreensão do gênero *Aphelandra*, podendo auxiliar taxonomicamente este grupo tão pouco estudado.

A reserva lipídica encontrada nos cotilédones das sementes influenciou diretamente no tempo médio de germinação, ocasionando um retardo na germinação. Entretanto, sementes oleaginosas são mais leves, favorecendo a dispersão, devido o fruto ser uma cápsula com deiscência explosiva.

A desinfestação das sementes de *A. nitida* é fundamental para testes de germinação em laboratório. O hipoclorito de sódio e o tempo de imersão influenciam diretamente na desinfestação e consequentemente na germinação das sementes, visto que no tratamento controle as sementes tiveram 100% de mortalidade devido à infestação fúngica. Recomenda-se a concentração de hipoclorito de sódio a 5% por 30 minutos para desinfestação das sementes de *A. nitida*.

As informações sobre o desenvolvimento pós-seminal de *A. nitida*, principalmente os caracteres foliares, reforçam as características encontradas nas plantas adultas, como, por exemplo, a anisofilia, sendo estas características morfológicas de grande importância para auxiliar os estudos taxonômicos e, em laboratório, para avaliar a qualidade fisiológica das sementes e interpretar testes de germinação.

Além dos conhecimentos obtidos através das formas de propagação e desenvolvimento da espécie, informações sobre o ambiente de luz em que a planta cresce é de fundamental importância. Desta forma, as condições de sombreamento aos quais as plantas foram submetidas influenciaram fortemente os parâmetros avaliados.

As plantas mostraram-se tolerantes ao pleno sol, observando alterações no aparato fotossintético como a redução na eficiência fotoquímica, sendo compensada por uma maior dissipação de calor e investindo em adaptações estruturais, como a redução da área foliar, aumento na espessura do parênquima paliçádico, aumento na densidade estomática e compostos lipídicos no mesófilo.

Os resultados do presente trabalho ressaltam a importância de estudos básicos para o entendimento dos mecanismos envolvidos na forma de propagação, tipo de reserva das sementes, desenvolvimento e plasticidade fenotípica das espécies frente às condições ambientais.